

**Université de Montréal**

**L'axolotl : un modèle pour la régénération osseuse**

**Par  
Mireille Pilote**

**Département de biochimie  
Faculté de médecine**

**Mémoire présenté à la Faculté des études supérieures  
en vue de l'obtention du grade de  
Maître ès Sciences (M. Sc.)  
en biochimie**

**Juin 2004**



**© Mireille Pilote, 2004**

W

4

U58

2004

v. 148

## AVIS

L'auteur a autorisé l'Université de Montréal à reproduire et diffuser, en totalité ou en partie, par quelque moyen que ce soit et sur quelque support que ce soit, et exclusivement à des fins non lucratives d'enseignement et de recherche, des copies de ce mémoire ou de cette thèse.

L'auteur et les coauteurs le cas échéant conservent la propriété du droit d'auteur et des droits moraux qui protègent ce document. Ni la thèse ou le mémoire, ni des extraits substantiels de ce document, ne doivent être imprimés ou autrement reproduits sans l'autorisation de l'auteur.

Afin de se conformer à la Loi canadienne sur la protection des renseignements personnels, quelques formulaires secondaires, coordonnées ou signatures intégrées au texte ont pu être enlevés de ce document. Bien que cela ait pu affecter la pagination, il n'y a aucun contenu manquant.

## NOTICE

The author of this thesis or dissertation has granted a nonexclusive license allowing Université de Montréal to reproduce and publish the document, in part or in whole, and in any format, solely for noncommercial educational and research purposes.

The author and co-authors if applicable retain copyright ownership and moral rights in this document. Neither the whole thesis or dissertation, nor substantial extracts from it, may be printed or otherwise reproduced without the author's permission.

In compliance with the Canadian Privacy Act some supporting forms, contact information or signatures may have been removed from the document. While this may affect the document page count, it does not represent any loss of content from the document.

**Université de Montréal**  
**Faculté des études supérieures**

**Ce mémoire intitulé :**  
**L'axolotl : un modèle pour la régénération osseuse**

**Présenté par :**  
**Mireille Pilote**

**A été évalué par un jury composé des personnes suivantes :**

<b>Président-rapporteur :</b>	<b>Gerardo Ferbeyre</b>
<b>Directeur de recherche :</b>	<b>Stéphane Roy</b>
<b>Membre du jury :</b>	<b>Florina Moldovan</b>

## Résumé

Les urodèles amphibiens, tel l'axolotl (*Ambystoma mexicanum*) sont les seuls vertébrés capables de régénérer, tout au long de leur vie, différentes parties de leur corps. La patte est la structure de choix pour étudier la régénération. De plus, elle est composée de différents tissus, incluant les os et le cartilage. Bien que l'os représente 50 % de la surface amputée, seulement 2% des cellules en dérivent lors de la régénération. Cela suggère que les nouvelles structures squelettiques sont générées à partir d'autres cellules. Notre hypothèse principale est que le processus d'ostéogenèse lors de la régénération de la patte est le même que lors du développement. Nous avons ainsi, cloné et caractérisé l'expression de trois gènes : *Sox-9*, *PTHrP* et *Cbfa-1*, reconnus pour leurs rôles lors des processus d'ostéogenèse et de guérison osseuse chez les autres vertébrés.

Les processus de guérison osseuse se mettent en place suite à un traumatisme infligé à l'os ou au cartilage. L'axolotl, reconnue pour pouvoir reformer des membres entiers, est-il simplement capable de guérir ou régénérer les fractures jointes ou non-jointes?

Les résultats obtenus démontrent que *Sox-9*, *PTHrP* et *Cbfa-1* sont impliqués autant lors du développement que de la régénération de la patte chez l'axolotl. Le processus d'ostéogenèse est donc conservé lors de ces deux processus. Les études de guérison des fractures, nous permettent de conclure que l'axolotl, comme les autres vertébrés, répare ces fractures jointes, mais est incapable de guérir des fractures non-jointes de dimension critique. L'axolotl possède donc les mécanismes de régénération et de guérison normale qui sont utilisés dans des situations différentes.

Mots clés : *Sox-9*, *PTHrP*, *Cbfa-1*, fractures jointes, fractures non-jointes, hybridation *in situ*, double coloration, os, cartilage

## Abstract

The axolotl (*Ambystoma mexicanum*) is a urodele amphibian with unsurpassed abilities to regenerate lost body parts throughout its life. The limb is the most studied appendage in the regeneration field. It's a complex structure composed of many types of tissues, including bone and cartilage. Curiously, during regeneration, less than 2% of cells are derived from bone. This suggests that the new bone is generated from cells other than the ones in preexisting bone.

The principal objective of this research is to determine the process by which the axolotl can regenerate their bone structures. During normal bone development there are many genes and molecules involved. Some of these are of particular interest: *Sox-9* is essential for chondrocyte differentiation, *PTHrP* is a hormone with a role in bone maturation and resorption and *Cbfa-1* is an essential molecule for chondrocyte differentiation into osteoblasts. Therefore, in order to understand better the formation of cartilage and bone during limb regeneration, we have cloned and characterized the expression of the aforementioned genes. The results shows that those genes are implicated during development and also during regeneration. Implying a conserved osteogenesis mechanism in those two processes.

We also asked if axolotls, with their great regenerating skills, are able to heal or regenerate union and non-union fractures. We demonstrate that axolotls can heal union fractures but are unable to heal the non-union fractures. We conclude that the axolotl possess two mechanisms to heal and regenerate its skeleton.

**Keys words:** *Sox-9*, *PTHrP*, *Cbfa-1*, union fracture, non-union fracture, whole-mount in situ hybridization, bone/cartilage double staining

## Table des matières

Résumé.....	iii
Abstract.....	iv
Table des matières .....	v
Liste des figures.....	vii
Liste des tables .....	ix
Liste des sigles et abréviations .....	x
Remerciements .....	xii
1 Introduction .....	13
1.1 Concepts de la régénération.....	13
1.2 La régénération chez les deux embranchements.....	14
1.2.1 Les invertébrés .....	14
1.2.2 Les vertébrés .....	16
1.3 L'axolotl, notre modèle .....	18
1.3.1 La régénération du membre chez l'axolotl .....	19
1.4 Gènes : rôles, implications, mécanismes d'action, expressions .....	23
1.5 Le développement et la régénération des structures osseuses du membre.....	25
1.6 Sox-9 .....	27
1.7 PTHrP.....	31
1.8 Cbfa-1.....	34
1.9 Régénération vs guérison osseuse .....	36
2 Matériels et Méthodes.....	39
2.1 Entretien des axolotls .....	39
2.2 Chirurgies sur les axolotls .....	39
2.3 Clonage des gènes d'intérêts .....	40
2.4 Caractérisation temporelle de l'expression des gènes d'intérêt par Northern Blot ..	42
2.5 Caractérisation spatiale de l'expression des gènes d'intérêt .....	43
2.6 Fixation et coloration des pattes fracturées .....	46
3 Résultats .....	48
3.1 Sox-9 .....	48
3.1.1 Clonage.....	48
3.1.2 Études d'expression.....	48

3.1.2.1 Développement.....	52
3.1.2.2 Régénération.....	56
3.2 PTHrP.....	59
3.2.1 Clonage.....	59
3.2.2 Études d'expression.....	61
3.2.2.1 Développement.....	61
3.2.2.2 Régénération.....	64
3.3 Cbfa-1.....	66
3.3.1 Clonage.....	66
3.3.2 Études d'expression.....	66
3.3.2.1 Développement.....	66
3.3.2.2 Régénération.....	68
3.4 Mise en place du squelette.....	72
3.4.1 Développement des membres.....	72
3.4.2 Régénération de la patte.....	74
3.4.3 Les fractures jointes et non-jointes.....	76
4 Discussion.....	80
4.1 Sox-9.....	80
4.1.1 Développement.....	80
4.1.2 Régénération.....	84
4.2 PHTrP.....	87
4.2.1 Développement.....	87
4.2.2 Régénération.....	89
4.3 Cbfa-1.....	90
4.3.1 Développement.....	90
4.3.2 Régénération.....	92
4.4 Fractures jointes non-stabilisées et non-jointes non-stabilisées.....	93
5 Conclusions et perspectives.....	96
6 Bibliographie.....	98
Lexique.....	110
Annexe 1 : Cartes des plasmides utilisés.....	112



## Liste des figures

Figure 1 : Schéma des différentes étapes de la régénération de la patte chez l'axolotl et ses principales phases.....	21
Figure 2 : Amputation proximale et distale.....	44
Figure 3 : Amorces dégénérées utilisées pour le clonage des gènes d'intérêts.....	49
Figure 4 : Alignements de la séquence clonée de <i>Sox-9</i> de l'axolotl avec différents vertébrés.....	51
Figure 5 : Expression de <i>Sox-9</i> au cours de différents stades de développement de l'axolotl .....	53
Figure 6 : Expression de <i>Sox-9</i> durant le développement de la patte avant de l'axolotl.....	55
Figure 7 : Expression de <i>Sox-9</i> durant les différents stades de la régénération de la patte avant de l'axolotl.....	57
Figure 8 : Analyse Northern de l'expression de <i>Sox-9</i> durant les différents stades de la régénération des pattes avant de l'axolotl.....	58
Figure 9 : Alignements de la séquence clonée de <i>PTHrP</i> de l'axolotl avec différents vertébrés.....	60
Figure 10 : Expression de <i>PTHrP</i> lors de différents stades du développement de l'axolotl.....	62
Figure 11: Expression de <i>PTHrP</i> lors de différents stades de développement de la patte avant de l'axolotl.....	63
Figure 12 : Expression de <i>PTHrP</i> durant les différents stades de la régénération de la patte avant de l'axolotl.....	65
Figure 13 : Alignements de la séquence clonée de <i>Cbfa-1</i> de l'axolotl avec différents vertébrés.....	67
Figure 14 : Expression de <i>Cbfa-1</i> lors de différents stades du développement de l'axolotl.....	69
Figure 15 : Expression de <i>Cbfa-1</i> lors du développement de la patte avant de l'axolotl.....	70
Figure 16 : Expression de <i>Cbfa-1</i> durant les différents stades de la régénération de la patte avant de l'axolotl.....	71
Figure 17 : Double coloration sur les différents stades de développement de la patte avant de l'axolotl.....	73

Figure 18 : Double coloration sur une larve d'axolotl au stade 44.....	73
Figure 19 : Double coloration sur des pattes à différents stades de la régénération de la patte avant de l'axolotl.....	75
Figure 20 : Double coloration effectuée sur une patte d'un axolotl mature.....	75
Figure 21 : Double coloration sur des pattes ayant subi des fractures jointes non- stabilisées.....	78

## Liste des tables

Table 1 : Tableau comparatif des pourcentages d'homologie entre le fragment d'ADNc de <i>Sox-9</i> , <i>PTHrP</i> et <i>Cbfa-1</i> cloné chez l'axolotl et celui de l'humain, du poulet, du rat, de la souris et du xénope.....	50
---	----

## Liste des sigles et abréviations

%	Pourcentage
®	Registered trademark
™	Trade Mark
μ	Micro (10 <sup>-6</sup> )
μL	Microlitre
μM	Micromolaire
°C	Degré Celsius
A	Adénine
ADN	Acide désoxyribonucléique
AMPc	Adénosine monophosphate cyclique
ARN	Acide ribonucléique
BSA	Bovine Serum Albumin
C	Cytosine
c-	Carboxy-
CAE	Coiffe Apicale Ectodermique
ADNc	Acide désoxyribonucléique complémentaire
DEPC	Diéthyl pyrocarbonate
dNTP	Déoxynucléotidetriphosphate
EDTA	Éthylènediamine tétra-acétate
EGTA	Ethylen glycol N,N,N',N' tetraacetic acid
<i>et al.</i>	et collaborateurs
EtOH	Éthanol
G	Guanine
g	Gramme
Hac	Acide acétique glaciale
kDA	KiloDalton
L	Litre
M	Molaire (mole/litre)
MEM	Solution saline composée de MOPS, EGTA et MgSO <sub>4</sub>
MEMFA	Fixatif contenant une solution de sel MEM et de la formaldéhyde

mg	Milligramme
min	Minutes
mL	Millilitre
mM	Millimolaire
NZY	Milieu de culture contenant : NaCl, Yeast extract et NZ amine
pb	Paires de bases
PBS	Phosphate buffered saline
PCR	Réaction de polymérisation en chaîne
PPD	Polyvinyl Pyrrolidone
RT	Reverse transcription
SDS	Sodium Dodecyl Sulphate
<i>sp.</i>	Species
SSC	Solution chlorure de Sodium et Sodium Citrate
sec	Secondes
SM	Tampon Sodium-Magnésium
T	Thymine
TAE	Tampon Tris-Acide Acétique et EDTA
v	Volume
w	Poids
ZPA	Zone d'Activité Polarisante, « zone of polarizing activity »

## Remerciements

J'aimerais tout d'abord remercier mon directeur de recherche Stéphane qui a réussi au cours de ces deux années à accomplir des miracles. Premièrement, il a su me guider et m'épauler à travers les hauts et les bas de mon projet de recherche. Il est, de plus, une source d'information quasi inépuisable qui m'a beaucoup aidée à écrire le présent travail. Finalement, de par sa nature généreuse et attentive, il a su faire ressortir le meilleur de moi-même et me faire réaliser à quel point j'aimais la recherche.

J'aimerais ensuite remercier les personnes avec lesquelles j'ai passé le plus clair de mon temps au cours de mon projet : Mathieu, Éric et Jean-Charles. Mes coéquipiers de laboratoire pour lesquels j'ai la plus grande affection et qui ont su chacun à leur manière laisser une trace dans ce travail. Merci pour les encouragements, les relectures et les longues minutes d'attente comblées.

Je tiens aussi à remercier les membres du laboratoire du Dr Jean Barbeau, Jacynthe, Annie, Sophie, ainsi que celui-ci. Merci de m'avoir donné ma première chance dans ce domaine, merci de votre grande gentillesse, votre générosité et votre disponibilité.

Je ne peux pas passer sous silence la contribution de plusieurs personnes avec qui j'ai interagi au cours des deux dernières années et qui ont tous contribué, de près ou de loin à mon projet, : Micheline, Matthieu, Ken, Dr. Nanci, Rima, Olivier, Dao, Martin, Dr Forest et M. Arcand.

Finalement, j'aimerais pouvoir traduire avec des mots l'immense contribution de mon loup, mes parents et ma petite soeur pour ce que je suis et ce que je viens d'accomplir. Merci pour votre amour, votre support inébranlable et vos encouragements de tous les instants. Je vous aime très fort.

# 1 Introduction

## 1.1 Concepts de la régénération

C'est au début du 18<sup>ième</sup> siècle que la première publication sur la régénération est parue, il s'agissait d'un article sur l'observation du phénomène chez le crabe, revu par Dinsmore [1, 2]. Au cours des années qui suivirent, beaucoup de scientifiques se penchèrent sur l'étude de ce phénomène étonnant. Il y a eu Trembley décrivant la régénération chez les hydres, Darwin chez les planaires et aussi Spallanzani, qui a été le premier à travailler sur la régénération des vertébrés [3-5]. Aujourd'hui, il y a encore plusieurs scientifiques qui s'intéressent aux mécanismes permettant de faire repousser une partie manquante. Mais contrairement aux études anatomiques de leurs prédécesseurs, les chercheurs actuels sont plus intéressés aux aspects génétiques et fonctionnels de ce phénomène unique. Ces études sont d'une importance capitale pour tendre vers une connaissance plus complète des mécanismes moléculaires et physiologiques qui interviennent lors de la repousse d'un membre ou d'un organe. Cette science, une fois comprise, pourrait permettre de repousser les limites de la médecine moderne et ainsi offrir aux patients ayant subi des amputations, des brûlures ou encore la perte de certains organes, de nouvelles possibilités de traitements et de remplacements des parties manquantes. Pour accomplir de tels progrès, il est essentiel de bien comprendre ce qui est déjà connu sur ce phénomène et comment des organismes aussi évolués que les salamandres peuvent régénérer des structures aussi complexes que leurs pattes.

La régénération est l'habileté que possède un organisme pleinement développé ou non de remplacer des tissus, organes ou membres, suite à une blessure ou à une amputation, par la croissance ou le remodelage de tissu somatique [6]. Certains auteurs, comme Wallace, en donne une définition simplifiée qui décrit le phénomène de la régénération comme étant la formation d'une partie manquante par ce qu'il reste de l'organisme [7].

La régénération est un processus encore bien mal compris et c'est Morgan, en 1901, qui a été le premier à définir les termes qui s'y rattachent. Il a décrit la régénération comme pouvant découler de deux principales sources. La première forme de régénération est celle dite morphallaxique, elle est caractérisée par le remplacement d'un tissu par le remodelage

des tissus restants, de même que par une absence de division cellulaire au niveau de celui-ci. L'autre type de régénération, dite épimorphique, nécessite quant à elle une division cellulaire pour reformer la partie manquante. On peut diviser la régénération épimorphique en deux sous-groupes, soit le processus requérant la dédifférenciation cellulaire et celui ne dépendant pas de celle-ci. Dans le premier cas, les cellules entourant le site d'amputation doivent reprendre l'état dédifférencié, prévalant lors du stade embryonnaire, pour reformer la structure manquante. Il n'en est pas de même lors de la régénération épimorphique qui ne dépend pas de la dédifférenciation des cellules. Dans ce cas, se sont des réserves de cellules-souches présentes un peu partout dans l'organisme qui migrent au site d'amputation et qui se différencient selon les besoins [6, 8].

La régénération, morphologiquement parlant, est un phénomène qui peut se dérouler de deux manières, elle peut être bidirectionnelle ou unidirectionnelle [9]. La première forme, la régénération bidirectionnelle, est le phénomène qui permet à tous les morceaux amputés de reformer un organisme à part entière. Par exemple, la queue amputée d'un planaire peut reformer une tête et vice et versa [6, 9]. L'autre type de régénération est unidirectionnelle puisque seulement une partie de l'organisme amputé peut reformer la partie manquante. Pour ce dernier cas, nous prendrons l'exemple de la patte de salamandre qui, une fois coupée, ne peut reformer le reste du corps de l'animal [9]. L'étude de différents modèles ayant la capacité de régénérer est importante pour bien comprendre les différences qui surviennent lors du processus et qui sont propres à chacun.

## **1.2 La régénération chez les deux embranchements**

### **1.2.1 Les invertébrés**

Chez les invertébrés, l'hydre est le modèle par excellence pour décrire la régénération de type morphallaxique [6]. En effet, lorsque l'on coupe une hydre en deux, les parties produites ont la capacité de reformer des hydres. Toutefois, les hydres résultantes seront de plus petites tailles que l'hydre d'origine. Par la suite, dans un milieu de culture adéquat, les hydres-filles grandiront jusqu'à ce qu'elles aient atteint la taille de l'hydre d'origine [3, 8]. Depuis les études de Morgan, bien des découvertes sont venues enrichir les connaissances du processus de régénération des hydres, notamment concernant



les gènes régulant l'établissement de l'axe antéro-postérieure lors de la régénération [6, 10]. Outre les hydres, les planaires, qui ont fasciné Darwin lors de l'un de ses voyages sont, eux aussi, dotés de la capacité exceptionnelle de pouvoir régénérer à partir de chacune des parties amputées.

Au-delà des observations de Darwin, c'est Trembley, il y a une centaine d'années, qui a fait connaître au monde entier les capacités régénératrices du planaire, sans toutefois en décrire le processus [3]. Ce n'est que vingt années plus tard que Pallas allait décrire le mécanisme de régénération des planaires [11]. Les planaires sont des organismes dont la régénération est non-dépendante de la différenciation cellulaire. En effet, réparties dans tout son corps, on retrouve des amas de cellules-souches totipotentes, appelées néoblastes. Lorsqu'il y a perte d'une des parties du planaire, les néoblastes avoisinants le site d'amputation migrent jusqu'à la blessure et se différencient selon les besoins cellulaires de l'organisme pour remplacer la partie manquante [6, 8, 12-16]. Il s'agit, en fait, d'un mode de régénération identique à celui prenant place durant les premiers stades du développement embryonnaire des vertébrés [17]. Avec le récent engouement pour la recherche sur les cellules-souches, les planaires, dont *S. mediterranae*, sont devenus des modèles de régénération tissulaire et de plasticité au cours du processus de la régénération [12, 18]. En plus du planaire, bien d'autres invertébrés possèdent aussi la capacité de régénérer certaines de leurs parties, c'est le cas pour les échinodermes, les plathelminthes et même les insectes [10].

Chez les insectes, c'est sur la drosophile (*D. melanogaster*), au niveau des disques imaginaux des pattes, que s'effectuent la plupart des recherches récentes sur la régénération. Ces disques sont des organes donnant naissance aux différentes parties de l'insecte (pattes, antennes, ailes, etc.) [19]. Lorsque la mouche perd une partie de la patte, c'est le disque imaginal, situé sur le segment qui précède le site d'amputation qui fournit les cellules non-différenciées. Celles-ci généreront le bout de la patte manquant sans qu'on y note aucune division cellulaire [19]. Notons, que seuls les insectes, qui ne traversent pas un stade pupal\*, possèdent de telles capacités de régénérer une fois adulte [10]. Les invertébrés sont très nombreux et une grande majorité de ceux-ci sont capables de régénérer toutes ou encore certaines parties de leurs corps, il n'en est pas de même chez les vertébrés.

\* voir Lexique

### 1.2.2 Les vertébrés

Chez les vertébrés, il y a très peu d'organismes capables de régénérer à l'âge adulte et lorsque certains sont dotés de cette capacité extraordinaire, elle ne s'applique souvent que pour certains organes et de tissus [20]. Un des exemples de ce phénomène est le poisson-zèbre, qui ne peut régénérer que les arêtes de ses nageoires et une partie de son cœur [21]. Par contre, comme pour les invertébrés, il semble que les stades embryonnaires des vertébrés possèdent tous une capacité de régénération plus ou moins grande selon les organismes [6, 22]. D'ailleurs, le bébé opossum a été utilisé pour plusieurs expériences de régénération au niveau des pattes car, à sa naissance, il est à un stade de développement très peu avancé comparativement à la plupart des autres vertébrés [23, 24]. En général, chez les vertébrés, lorsque l'organisme est encore au stade embryonnaire, son corps contient un nombre plus élevé de cellules-souches totipotentes, ce qui permet une très grande plasticité cellulaire [22]. De même, lorsqu'il y a une lésion, ces cellules se différencient selon les besoins de l'organisme pour assurer sa guérison. Le planaire, tel que vu précédemment, imite un peu ce principe, à la différence près qu'il possède des réserves de ces cellules-souches tout au long de sa vie [6, 8, 12-16]. Parmi les vertébrés aptes à régénérer, notons que l'être humain est lui-aussi capable de reformer certaines parties de son corps.

En effet, aussi surprenant que cela puisse paraître, les humains aussi possèdent une certaine capacité à régénérer. En fait, l'humain jusqu'à l'âge d'environ vingt-trois ans peut régénérer parfaitement une structure aussi complexe que la partie du doigt située au niveau de la dernière phalange [25]. C'est Illingworth, qui a été la première à faire la démonstration d'un tel phénomène [25]. Ce médecin, en travaillant à l'urgence d'un hôpital, a observé que si le site d'amputation était situé en haut de la dernière phalange et que la plaie n'était pas refermée par des points de suture, le bout du doigt de l'enfant finissait par repousser complètement et parfaitement [25]. On peut aussi penser, à tort, que les tissus comme la peau et le sang sont d'autres bons exemples de régénération. Toutefois, les cellules sanguines sont produites à partir de précurseurs hématopoïétiques et la reformation de la peau est un phénomène de kératinisation des cellules des couches dermales sous-jacentes. Nous appelons ces deux phénomènes du renouvellement plutôt que de la régénération [22].

Un autre phénomène peut aussi soulever bien des questions: la régénération hépatique. En effet, il semble que certains vertébrés, incluant l'humain, possèdent la capacité de "régénérer" une partie de leur foie et canaux biliaires, lorsque ceux-ci sont endommagés ou excisés [26, 27]. Il est très important de faire ici la différence entre la vraie régénération, celle définie plus haut, et le phénomène d'hyperplasie compensatoire ou régénération compensatoire. Dans le phénomène d'hyperplasie compensatoire, les hépatocytes matures, jusqu'ici bloqués en phase 0, sont, via des signaux moléculaires, réintroduits dans le cycle cellulaire et se mettent à proliférer de manière inhabituelle. Cette étape de prolifération s'accompagne toujours d'une phase intense de remodelage des tissus environnants [28, 29]. La prolifération ne s'arrêtera que lorsque l'organe aura repris sa taille normale. Dans le cas inverse, où le foie se voit greffer un lobe en trop, il y a déclenchement d'un processus d'apoptose qui a pour but d'éliminer les hépatocytes en surnombre [30]. Le phénomène de régénération compensatoire ne peut donc pas se comparer à la vraie régénération qui fait intervenir la dédifférenciation cellulaire. Les amphibiens, par contre, peuvent se vanter de posséder cette capacité hors du commun.

C'est Spallanzani, en 1768, qui a découvert les propriétés extraordinaires de régénération des amphibiens [5]. Suite à ses découvertes, les poissons et les reptiles se sont aussi ajoutés au groupe restreint des animaux régénérant par dédifférenciation cellulaire [9]. Les amphibiens sont, depuis longtemps, les modèles par excellence pour l'étude de la régénération autant au niveau anatomique, tissulaire que cellulaire et ils ont contribué à mieux comprendre les principes de base de l'organisation de ce phénomène [31]. Malgré cela, les chercheurs étudiant la régénération ont semblé, pendant quelques années, délaisser ce modèle tout à fait unique. Les principales raisons de cet abandon temporaire sont : la lenteur du processus de régénération, la taille du génome de plusieurs organismes et les difficultés rencontrées lors des manipulations génétiques [12, 32]. Heureusement, aujourd'hui, la découverte de nouveaux outils d'analyse en biologie moléculaire, comme l'analyse fonctionnelle par vecteurs viraux, le décryptage du génome et les projets EST (Expressed Sequence Tag) adaptés pour ces organismes, font en sorte qu'il est maintenant devenu plus facile d'étudier ces modèles d'un point de vue moléculaire [12, 31, 33, 34]. Les amphibiens sont donc dotés de capacités exceptionnelles de régénération, mais à l'intérieur même de la classe des amphibiens, on retrouve de très grandes différences au niveau des deux ordres qui la composent, soit les anoures et les urodèles.

Les anoures, dont fait partie le xénope (*Xenopus laevis*), est l'un des cinq modèles principaux de recherche en laboratoire [10]. Les grenouilles possèdent de grandes capacités régénératrices, mais celles-ci ne sont parfaitement actives et fonctionnelles qu'au stade larvaire [7]. C'est au moment de leur métamorphose, qui consiste en une résorption des branchies suivie d'une mise en fonction des poumons de manière à passer d'un mode de vie aquatique à un mode de vie terrestre, que les anoures semblent perdre leur capacité de régénérer parfaitement leurs membres [21, 35, 36]. Plusieurs études ont été effectuées pour bien caractériser les facteurs qui, lors de la maturation de la larve de xénope, font en sorte que celle-ci perd sa capacité de régénération parfaite [37]. En fait, si on ampute une patte de la forme adulte du xénope, il y a bel et bien une structure qui repousse, mais celle-ci ressemble plus à une pointe effilée dénuée d'articulation qu'à une patte [35, 38]. Le stade larvaire semble donc le moment-clé pour étudier la régénération parfaite du membre chez les anoures, par contre les urodèles nous fournissent une toute autre version.

Chez les urodèles, dont font partie les tritons (*Triturus sp.*), l'axolotl (*Ambystoma sp.*) et les salamandres (*Salamandra sp.*), la capacité de régénérer parfaitement les membres et organes s'étend tout au long de leur vie [5, 7, 20]. En général, mis à part le fait que les amphibiens ne sont pas des mammifères, c'est le modèle de régénération, chez l'adulte, qui se rapproche le plus de l'être humain [32]. De plus, les urodèles possèdent des capacités de régénération jusqu'ici inégalées, ils peuvent ainsi régénérer plusieurs membres et organes tels les pattes, la queue, les branchies, la mâchoire, la rétine, la moelle épinière, une partie du cœur, une partie du cerveau et la peau [7, 9, 21, 39]. Les urodèles, du point de vue de la biologie moléculaire, sont surtout étudiés pour caractériser l'information positionnelle lors de la repousse d'un membre, la plasticité et la réversibilité de l'état différencié des cellules, mais aussi parce qu'ils pourraient expliquer pourquoi la capacité de régénérer n'est pas présente chez les autres vertébrés [20, 39]. Parmi les urodèles, une espèce nous intéresse plus particulièrement, il s'agit de l'axolotl.

### 1.3 L'axolotl, notre modèle

L'axolotl (*Ambystoma mexicanum*) est un modèle d'étude très répandu pour essayer de comprendre la régénération chez l'adulte. L'*Ambystoma mexicanum* possède la particularité de ne pas métamorphoser, elle garde donc un mode de vie aquatique tout au

long de sa vie. Cette caractéristique la rend très facile à garder en laboratoire et aussi très facile à traiter, car il est alors possible d'ajouter des traitements à l'eau dans laquelle l'animal baigne [7, 34]. Il faut aussi mentionner ici qu'il est possible d'induire la métamorphose des axolotls et autres amphibiens, en ajoutant à leur eau de la thyroxine, une hormone produite par la glande thyroïde [40]. Chez l'axolotl, contrairement au xénope, la capacité de régénérer n'est pas altérée avec la métamorphose de l'animal [41]. De plus, c'est un animal qui se reproduit très bien en captivité et il existe, à l'heure actuelle, plusieurs mutants albinos dont certains possèdent des marqueurs génétiques bien caractérisés [42]. De plus, l'existence de bibliothèques d'ADN complémentaire, de projets EST (Expressed Sequence Tag) et la synthèse de vecteurs viraux fonctionnels chez l'axolotl sont des outils qui permettent d'élargir l'éventail des techniques utilisables pour l'étude chez ce modèle animal [31, 34, 43]. L'excellente connaissance et caractérisation anatomique du processus de la régénération de la patte chez cet animal est aussi l'un des nombreux avantages que procure ce modèle [44-47].

### **1.3.1 La régénération du membre chez l'axolotl**

La régénération de la patte chez l'axolotl est, depuis longtemps, très étudiée car elle procure de nombreux avantages à son investigateur. La taille du membre, l'accessibilité et la facilité des manipulations autant chirurgicales (amputations) que chimiques (traitement aux inhibiteurs, etc.) au niveau de la patte, rendent cet outil expérimental quasi incontournable dans l'étude de la régénération appendiculaire [45, 48]. En fait, l'étude de la patte possède un avantage scientifique indéniable, car il s'agit d'une structure très complexe qui contient une variété de cellules différenciées et de tissus inclus dans un environnement très organisé [6, 49]. Il est donc possible, lors de la repousse du membre, de faire l'étude de plusieurs types cellulaires, de leur origine ainsi que des mécanismes qui les régulent durant le processus de la régénération. Il est aussi aisé de bien identifier les différents stades de régénération de la patte et ainsi viser une étude moléculaire aux différentes étapes du processus.

Avant de décrire le processus de repousse du membre, il est important de dire que peu importe l'endroit sur la patte où l'amputation a été pratiquée, proximale ou distale par rapport au corps de l'animal (voir figure 2, section 2 (Matériels et méthodes)), la séquence

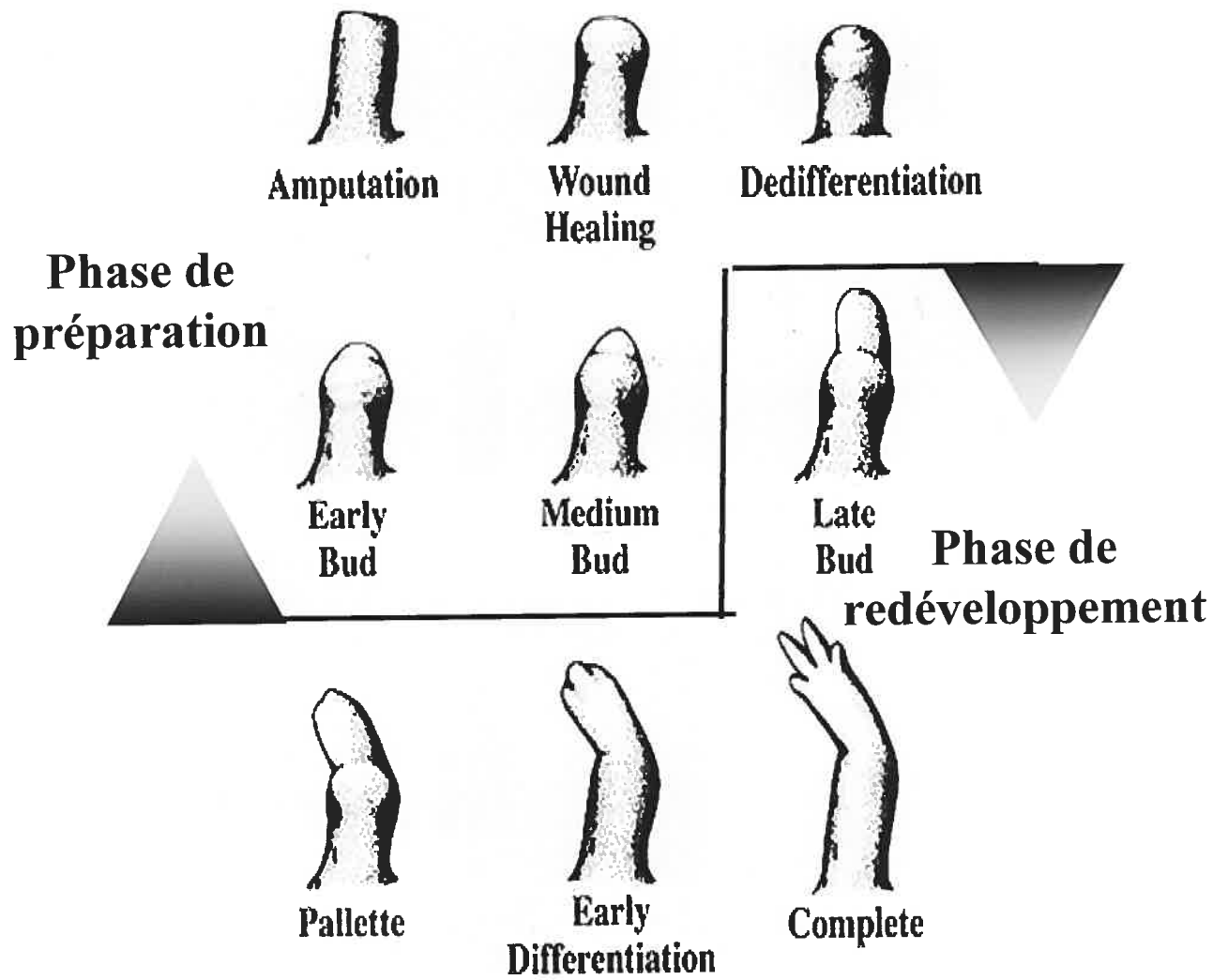
des événements de la régénération reste la même [7]. La régénération du membre se divise en trois phases : la phase de guérison, de préparation et la phase de redéveloppement (figure 1)[31].

La phase de guérison débute immédiatement suite à l'amputation. La partie venant d'être amputée est, en moins de quelques heures, couverte d'une couche de cellules épithéliales ayant migrées vers la plaie depuis la périphérie [9]. Cette mince couche cellulaire transparente se nomme épithélium de guérison. La formation de cette strate est essentielle au déroulement du reste du processus de repousse [9, 45, 50]. Gardiner *et al.*, ont démontré que certains gènes exprimés lors de la phase de guérison sont inhibés lorsque l'épithélium de guérison est enlevé [32, 51, 52]. Quelques heures après l'établissement de l'épithélium de guérison, celui-ci s'épaissit pour former ce que l'on appelle la coiffe apicale épidermique (CAE) [42]. Il semble qu'à ce stade, l'épithélium ait une fonction sécrétoire, mais les substances relâchées par la CAE et leurs rôles sont encore nébuleux [20, 42]. Par contre, Globus soumet l'hypothèse que la CAE produit un signal pour amorcer la division des cellules du futur blastème [53]. Mais bien avant l'apparition du blastème, il y a des signaux qui sont envoyés au système immunitaire de l'animal, car il y a eu détérioration du tissu en général au site d'amputation. Les phagocytes\* s'accumulent donc au bout de la patte amputée et ils ont la charge d'enlever tous les débris cellulaires et d'attaquer la matrice extracellulaire [7]. La destruction de la matrice extracellulaire des tissus endommagés est essentielle pour libérer les cellules mésenchymateuses sous-jacentes [7]. Ces cellules ainsi dégagées proviennent en grande majorité du derme, mais aussi des tissus squelettiques environnants (chondrocytes, fibroblastes, etc.) [20]. La majorité des cellules avoisinant le site d'amputation entrent donc dans le cycle cellulaire et perdent leur état différencié [6, 20, 31, 32].

Lors de la phase de préparation, outre la dédifférenciation de la majorité des cellules mésenchymateuses entourant le site d'amputation, il existe aussi un processus qui active les réserves de cellules dédifférenciées quiescentes, se trouvant à proximité de la blessure [31]. C'est lors de cette phase que les cellules dédifférenciées migrent vers la coiffe apicale épidermique et entrent dans une phase de division cellulaire très intense pour former ce que l'on appelle le blastème de régénération [31]. Le blastème est, en fait, une zone de croissance mésenchymateuse où les cellules dédifférenciées prolifèrent, se redifférencient et s'organisent pour former la partie du membre à régénérer [7, 54]. En fait, les cellules qui

\* voir Lexique

**Figure 1 :** Schéma des différentes étapes de la régénération de la patte chez l'axolotl et ses principales phases





peuplent le blastème possèdent le potentiel de se diviser pendant au moins 200 générations sans démontrer de signe de sénescence [55]. Parmi les cellules proliférant à l'intérieur du blastème, on retrouve des cellules non-différenciées d'origine fibroblastique. Plusieurs études ont mis en évidence l'importance de ce type cellulaire, en effet, elles auraient un rôle à jouer au niveau du contrôle de la croissance et l'organisation des autres types cellulaires lors de la régénération [45, 56, 57]. La phase de préparation se termine par l'accumulation de cellules dédifférenciées dans le blastème [7, 31].

La phase qui suit est ce que l'on appelle le redéveloppement du membre, c'est la dernière phase qui permet à l'organisme de reformer son membre complètement. C'est une phase essentiellement de croissance et de mise en place des différents patrons sur lesquels sont basés une patte mature [31]. Il a été démontré que les mécanismes de croissance et de mise en application des différents patrons de positionnement sont identiques à ceux que l'on retrouve lors du développement embryonnaire de la patte [58, 59]. Ainsi, le blastème serait une réplique fonctionnelle du bourgeon de développement de la patte [60]. La redifférenciation cellulaire est le principal phénomène se déroulant lors de cette partie de la régénération, car les cellules du blastème prennent l'identité de différentes cellules qui peupleront le tissu en cours de régénération [7]. Cette dernière phase, tout comme les deux premières décrites plus haut, se divise en plusieurs étapes décrivant les principaux changements morphologiques de la patte.

Premièrement, lors de la phase de guérison, on retrouve l'étape de la guérison de la plaie (*wound healing* WH). Les étapes qui suivent se trouvent toutes lors de la phase de préparation. Le stade suivant est celui de la dédifférenciation des cellules du mésenchyme (DD). Il y a ensuite, l'étape du bourgeon primaire (*early bud* EB) que Tank *et al.* décrit comme la première manifestation externe de la régénération, elle se caractérise par le blastème qui prend la forme d'un cône plat souvent asymétrique et dont l'apex est blanchâtre [61]. Le blastème, lors de cette étape, s'allonge très rapidement pour donner naissance au bourgeon intermédiaire (*medium bud* MB). Lors de cette étape, le blastème prend encore plus l'apparence d'un cône dont la face ventrale devient convexe et la face dorsale concave, le bout du bourgeon intermédiaire demeure d'une couleur blanchâtre [61]. Les étapes subséquentes se retrouvent lors de la phase de re-développement du membre. L'étape suivante, au bourgeon tardif (*late bud* LB), le blastème devient plat et c'est alors que se définit plus précisément l'orientation des axes par rapport à l'animal [61]. Vient ensuite le stade que l'on appelle palette (P). Lors de cette étape, le blastème continue de

s'aplatir et les premières traces des futurs doigts apparaissent sous forme de deux bosses à l'apex du blastème entre lesquelles on retrouve une légère dépression [61]. La dernière étape est la fin de la croissance des doigts (*digital outgrowth* DG ou *early differentiation* ED). Ce stade vient compléter la phase de re-développement et aussi le processus de la régénération de la patte. Toutes ces étapes de la régénération (WH, EB, MB, LB, PAL et ED) sont facilement identifiables sous un stéréoscope ce qui nous permet de reconnaître approximativement à quelle étape de la régénération la patte de l'animal est rendue. Ainsi, il est possible d'orienter nos études de caractérisation moléculaire en fonction du stade de régénération de la patte.

Beaucoup de facteurs viennent influencer la repousse du membre : la température [62], l'illumination [7] et les changements hormonaux [7] en sont quelques exemples [42]. Par contre, depuis des décennies, les chercheurs ont suspecté qu'il y avait un élément-clé essentiel à la régénération, aujourd'hui on sait qu'il s'agit de la présence des nerfs [63, 64]. En effet, chez l'axolotl, lorsque le membre est dénervé avant qu'il ait atteint le bourgeon intermédiaire, les cellules différenciées, sous le blastème, vont entrer en apoptose et seront ensuite enlevées par les macrophages, ce qui aura pour conséquence d'arrêter le processus de régénération du membre [6, 65]. En fait, le membre a absolument besoin d'être innervé jusqu'à l'étape du bourgeon tardif [48]. Au delà de l'étape du bourgeon tardif, la régénération se poursuit même s'il y a dénervation [66, 67]. Bien des expériences ont été exécutées dans le but de comprendre les mécanismes qui permettent aux nerfs de réguler aussi fortement la régénération du membre chez l'axolotl, malgré cela, très peu de réponses ont été apportées jusqu'ici [31, 32, 45].

Les trois phases (guérison, préparation et redéveloppement) décrites plus haut ne sont pas aussi bien définies que l'on pourrait le croire, malgré les informations mentionnées ci-haut. Les seuls marqueurs qui distinguent une phase d'une autre et qui soient vraiment fiables, sont les différents gènes qui sont exprimés à des moments précis de la régénération [31].

#### **1.4 Gènes : rôles, implications, mécanismes d'action, expressions**

De nombreux et récents progrès portant sur la caractérisation moléculaire et cellulaire de la régénération du blastème permettent de mieux comprendre les mécanismes

qui sous-tendent la repousse d'un membre chez l'axolotl [48]. Les mécanismes de régulation des gènes semblent impliquer deux principaux types de signaux : les premiers signaux sont relâchés en réponse aux traumatismes que les tissus entourant le site d'amputation ont subis. Les seconds signaux sont très spécifiques à la régénération du membre, ils ne relèvent donc pas du phénomène inflammatoire. Par contre, ils dépendent des premiers signaux, et ce, malgré le fait qu'ils ne soient pas induits par ceux-ci. En fait, leur mécanisme d'activation et d'action sont encore méconnus, mais leur induction pourrait bien être liée aux dommages que subissent les vaisseaux et les nerfs lors de l'amputation [32].

Les gènes et leur expression sont les éléments-clés régulant la séquence des événements qui permet la repousse du membre. Ainsi, c'est à peine une heure après l'amputation, c'est-à-dire lors de la mise en place de l'épithélium de guérison, que le gène *Msx-2* est exprimé. Jusqu'à maintenant, il est le premier gène à être exprimé suite à l'amputation du membre [32]. Un peu plus tard, ce gène régulé sera exprimé dans l'épiderme de guérison et aussi, bien que moins fortement, dans le mésenchyme sous-jacent. En plus de *Msx-2*, il y a d'autres gènes, ceux exprimés hâtivement qui sont induits durant les 24 premières heures de la régénération de la patte. Par exemple, on dénote que certains gènes de la famille des *Mmp* et les gènes de la famille des *Hox* font partie de cette catégorie [32, 68]. La majorité de ces gènes sont exprimés pour rétablir l'identité positionnelle du membre amputé, mais les mécanismes régulant ces événements sont encore inconnus. Cependant, certaines hypothèses laissent croire que la détermination des axes pourrait bien faire intervenir des facteurs relâchés en réponse au stress de l'amputation. Des épisodes tardifs, mais tout aussi critiques, d'activation des gènes prennent place vers le septième jour. Parmi les gènes exprimés à ce moment, *Shh* (*Sonic hedgehog*) qui détermine, quant à lui, l'axe antéro-postérieur [31, 48], les *Fgf* (*fibroblasts growth factors*) qui sont des facteurs de croissance qui possèdent un effet mitotique. En effet, l'injection de *Fgf* exogène, peut contrebalancer une absence d'épithélium de guérison qui, on le sait, est un élément essentiel à la poursuite du processus normal de la régénération [32].

Les *Fgf* tout comme les *Bmp* (*bone morphogenic protein*), *Msx-1*, *Shh* et *Hoxd* sont tous des gènes impliqués dans la détermination de l'identité du membre par rapport aux différents axes du corps (proximodistal, antériopostérieur et dorso-ventral) [48]. Toutefois,

il existe un seul vrai témoin de l'action de tous ces gènes et c'est la formation du squelette qui est l'armature même du membre en formation.

### 1.5 Le développement et la régénération des structures osseuses du membre

Le développement du squelette chez l'embryon implique trois lignées cellulaires distinctes. Les structures cranio-faciales dérivent des cellules de la crête neurale\*, le squelette axial (vertèbres, cage thoracique, etc.) provient du sclérotome\* et enfin le mésoderme des plaques latérales\* donne naissance aux appendices [69]. C'est au niveau du squelette appendiculaire que s'attardera cette revue, car c'est au niveau du membre que portera l'étude des mécanismes de la régénération osseuse chez l'axolotl. La première étape lors de la formation des membres est d'assigner un patron spatial aux futurs appendices. Ce sont les gènes de la famille des *homeobox* (*Hox*), qui sont en grande partie responsables de ce positionnement spatial [69]. Plus tard, la zone d'activité polarisante (ZPA) d'où émanera tous les signaux nécessaires à la régulation du patron spatial du membre, apparaîtra sous la coiffe apicale ectodermique au niveau du bourgeon du membre. *Sonic hedgehog* (*Shh*), sous l'influence de l'acide rétinoïque, est le responsable de toute l'activité inductive provenant de la ZPA, il induit des gènes, tels que le facteur de croissance des fibroblastes (*Fgf*), les gènes *homeobox* (*Hoxd-13*) et *Bmp-2* (*bone morphogenetic protein-2*), tous responsables de la croissance du membre selon un patron bien défini [69]. Une fois que le patron d'expression spatial est établi pour le membre en formation, il y a migration, à partir des plaques latérales, des cellules mésenchymateuses non-différenciées, probablement sous l'action des membres de la famille des *Tgfb* (*transforming growth factor  $\beta$* ) et des *Fgf*, vers le bourgeon du membre [69-71]. À cet endroit, les cellules non-différenciées, via des interactions épithélio-mésenchymateuses médiées par des molécules d'adhésion et l'action de certains gènes, vont s'agréger pour former des contacts intercellulaires étroits indispensables pour la poursuite du processus d'ossification [70, 72]. La condensation des cellules et les interactions épithélio-mésenchymateuses sont contrôlées, en grande partie, par *Tgfb*, *Bmp-2*, *Pax* et *Msx-1* [70, 73]. *Sox-9*, dont l'analyse des caractéristiques et fonctions sera effectuée dans une section ultérieure, est aussi impliqué lors de la condensation des précurseurs chondrocytaires\* [74]. C'est suite à cette agrégation, que les cellules, grâce aux *Bmp*, *Hox* et *Msx*, acquièrent un autre phénotype. En effet, elles passent

\* voir Lexique

d'allure fibroblastique, longues avec des prolongements, à une forme plutôt ronde et plus grosses qu'auparavant. Cet accroissement de taille est dû à une augmentation du volume cytoplasmique de quelques organites cellulaires [72]. Ces cellules chondrocytaires produisent maintenant de la matrice cartilagineuse (collagène type II) et entament leur maturation vers des cellules synthétisant la matrice osseuse et responsables de la formation du futur os [69].

C'est à partir de cette étape qu'il est important de faire une différence entre les deux types d'ossification qui donneront naissance à tous les os composant le squelette. Il y a tout d'abord l'ossification intramembranaire qui donne naissance, entre autres, aux os du crâne. Ce type d'ossification se caractérise par une vascularisation des tissus environnants et une différenciation directe des précurseurs mésenchymateux non-différenciés en ostéoblastes\* qui formeront la matrice osseuse [69, 72]. Vient ensuite l'ossification endochondrale, qui forme la grande majorité des os du squelette. Étant donné que les membres sont formés à partir d'un processus d'ossification endochondrale, il n'y aura dorénavant plus de référence à l'ossification intramembranaire. Voici maintenant comment se déroule le processus d'ossification endochondrale. Les chondrocytes\* sont donc condensés au niveau du bourgeon du membre où ils sont soumis à un ballottage. En effet, le chondrocyte peut se diriger vers deux destinées cellulaires, il peut rester à l'état de cartilage permanent\* pour se retrouver aux surfaces articulaires des os ou encore il peut servir de structure de base à l'os en formation à travers le mécanisme d'ossification endochondrale [69]. Une fois les cellules engagées dans le processus d'ossification, elles donnent la forme de l'os à venir, sous l'influence des *BMP* et des *Hox*. Les chondrocytes, qui se retrouvent au centre de cette structure cartilagineuse, subissent un cycle de prolifération rapide, régulée par *PTHrP* [75], pour ensuite arrêter leur cycle cellulaire. Ces chondrocytes deviennent hypertrophiés (augmentent de 20 fois leur volume intracellulaire), grâce à l'action de *PTHrP* (voir section 1.7) et changent encore une fois leur programme génétique pour produire un autre type de collagène, le type X [75, 76]. C'est sous l'action des chondrocytes hypertrophiques\*, qui sont des cellules régulatrices et productrices de matrice, que l'os va se former. En effet, ce sont ces cellules qui dictent la minéralisation des tissus environnants, attirent les vaisseaux sanguins via certains facteurs qu'ils relâchent et attirent aussi les chondroclastes\* [75]. Les chondrocytes hypertrophiques sont responsables de guider les cellules péri-chondriales\* adjacentes vers leur destin d'ostéoblastes via l'action de *Cbfa-1*, gène qui fera l'objet d'une section ultérieure [77]. Les ostéoblastes sécrètent la

\* voir Lexique

matrice qui servira à mettre en place l'os [75]. Les chondrocytes continueront à proliférer tant que l'os n'aura pas atteint sa longueur optimale, après cela, les chondrocytes entrent en apoptose et deviendront calcifiés, c'est un peu plus tard qu'ils seront remplacés par les ostéoblastes [72]. Il se forme souvent, c'est le cas pour les os longs, des centres secondaires d'ossification qui se développent aux extrémités de l'os [72]. C'est justement entre ces deux centres d'ossification (milieu et extrémité de l'os) que la zone de croissance de l'os va prendre place [72]. Bien sûr, les os poussent en longueur, mais ils poussent aussi de manière centripète. C'est dans ce processus que les chondroclastes\* entrent en jeu. Ce sont des cellules d'origine hématopoïétique qui arrivent au site d'ossification via les vaisseaux sanguins. Ce sont des cellules essentielles à la bonne mise en forme de l'os puisque ce sont elles qui, en détruisant la matrice osseuse, font en sorte que l'os ne devienne pas disproportionné par rapport au membre en formation. De plus, les chondroclastes s'assurent qu'il y ait suffisamment d'espace à l'intérieur de l'os en formation pour y établir la moelle osseuse [69]. Il est essentiel de maintenir un bon équilibre entre l'ossification et la résorption osseuse lors de la formation des os, tant dans des conditions physiologiques que pathologiques telles les maladies de dégénérescence osseuse comme l'ostéoporose [75, 78].

Une fois encore, la formation du squelette du membre requiert l'action d'une multitude de gènes. Les gènes *Sox-9*, *PTHrP* et *Cbfa-1*, plus particulièrement ciblés dans cette revue, semblent impliqués de manière plus spécifique dans la mise en place de cette structure de charpente et très probablement avoir un rôle lors de la régénération des structures osseuses du membre chez l'axolotl.

## 1.6 Sox-9

Le gène *Sox-9* a été cloné pour la première fois en 1994 chez la souris, par deux groupes de chercheurs : l'équipe de Wagner et l'équipe de Foster [79, 80]. *Sox-9* est un facteur de transcription de la famille des *Sox* (*Sry-type HMG box*), cette famille compte près de 24 membres et fait partie d'un groupe de gènes voisins des *Sry* (*sex determination-related to Y chromosome*), facteurs mieux connus pour leurs rôles dans la détermination des testicules des mammifères liée au chromosome Y [81, 82]. Les *Sry* ainsi que les membres de la famille des *Sox* sont liés par un domaine *HMG* (*high mobility group*) où l'on constate une grande homologie de séquence entre les deux groupes de gènes. Le domaine *HMG* de

\* voir Lexique

*Sox-9* possède 79 acides aminés et près de 50% de la séquence est identique aux *Sry* [83]. C'est, en fait, par ce domaine que la protéine *Sox* se lie à une séquence de sept paires de bases dans le sillon mineur de l'ADN [84-86]. Cette séquence définit la spécificité de la liaison de l'ADN avec les protéines de la famille des *Sox* et elle est composée d'une région consensus nommée l'élément de liaison « *core* » des *Sox* (SCBE, *Sox* core-binding element), formée des bases suivantes : AACAAAT. Chaque membre de la famille des *Sox* possède des régions adjacentes à la SCBE qui leur est propre. Par exemple, pour se lier de façon optimale à l'ADN, *Sox-9* doit posséder cette séquence AGAACAATGG. Cette liaison de *Sox-9* à l'ADN peut entraîner une courbure de celle-ci, car le domaine de liaison HMG est en forme de L [83] ce qui entraîne ainsi une forme de régulation de la transcription [87]. *Sox-9* est aussi capable d'intervenir dans le mécanisme de maturation des transcrits primaires des ARN messagers [88]. De plus, la protéine *Sox-9* possède, en C-terminal, un domaine d'activation de la transcription qui lui confère un autre mode d'action [86]. Avec ses nombreux mécanismes d'action, il n'est pas surprenant d'apprendre que *Sox-9* possède plusieurs rôles autant lors du développement que durant toute la vie de l'organisme.

Lors du développement, les protéines *Sox* ont un rôle critique dans la régulation de nombreuses étapes de ce processus. Ainsi, durant l'embryogenèse, *Sox-9* a une fonction lors de la détermination du sexe, du développement des cellules pré-B et cellules T, ainsi que lors de l'induction neurale [89]. De plus, il est exprimé dans le tissu cardiaque et dans le système urinaire au niveau du rein [74, 86]. Une mutation d'un seul allèle de *Sox-9*, chez l'humain, est responsable d'une maladie qui se nomme la dysplasie campomélique (CD). Cette maladie affecte un nouveau-né sur 20 000, il s'agit, en fait, très souvent d'une mutation au niveau du domaine HMG de la protéine *Sox-9* [90]. Cette maladie se traduit par un changement de sexe autosomal dominant chez la majorité des bébés mâles possédant la mutation de *Sox-9* sur le chromosome 17 [80]. Cette situation particulière s'explique par le fait que *Sox-9* est un gène qui est très apparenté à la famille des *Sry*, un gène nécessaire à la détermination du sexe via la formation ou non des testicules lors du développement embryonnaire [81]. La dysplasie campomélique est aussi diagnostiquée à l'aide de caractères physiques particuliers car elle se traduit par une multitude de défauts du squelette, tels des courbures prononcées aux os longs, des côtes en nombre moindre et des déformations du squelette cranio-facial [79, 80]. Cette maladie peut aussi entraîner un mauvais fonctionnement au niveau des systèmes cardiaques, auditifs (affecte les osselets de

l'oreille interne), rénaux, respiratoires (hypoplasie trachéobronchiale du cartilage et cage thoracique de taille réduite) et nerveux central (retards mentaux) [74, 86].

En fait, les anomalies que présente le squelette au cours de cette maladie sont reliées à un autre rôle très important de *Sox-9*, qui est un élément-maître de la régulation du processus de chondrogénèse\* chez l'embryon [82, 91]. Ce processus est très important, car c'est à partir de cette étape qu'il y aura formation de l'os via les chondrocytes au cours de l'ossification endochondrale [74]. En fait, *Sox-9* est exprimé au niveau des cellules précurseurs des chondrocytes ainsi que lors de la condensation de ces préchondrocytes\*. Il est aussi responsable de la différenciation des cellules mésenchymateuses en chondrocytes et participe par la suite à la maturation et à la prolifération des cellules chondrocytaires. Wright *et al.*, ont démontré que l'expression de *Sox-9* commence, chez la souris, dès le neuvième jour après la fécondation, et ce, au niveau du mésenchyme crânien, des arcs branchiaux et des somites rostraux. Trois jours plus tard, l'implication de *Sox-9* dans le développement du squelette est confirmée par son expression [74] dans des structures colorées par le bleu alcian, principal colorant du cartilage. Une autre preuve a été apportée en 1997, par le groupe de Koopman, confirmant l'importance de *Sox-9* lors du développement du cartilage, il s'agit de sa coexpression avec *Col2a1* qui code pour une composante majeure de la matrice extracellulaire du cartilage; le collagène type IIa [86]. Le collagène de type II est très important pour le maintien de l'intégrité du cartilage, car il représente près de 60% de toutes les protéines qu'on y retrouve. Il a été démontré que la protéine *Sox-9* se lie directement sur des sites consensus *Sry/Sox* (AACAAT) situés dans les régions régulatrices du gène (au niveau du premier intron), ce qui aurait pour effet d'activer la transcription de celui-ci [84, 86]. La coexpression de ces deux gènes est notée par Ng et son équipe, aussi tôt que 8,5 jours après la fécondation au niveau du mésenchyme crânien. Ensuite, contrairement à *Col2a1* qui reste exprimé longtemps, l'expression de *Sox-9* diminue de plus en plus dans les zones où la chondrogénèse est terminée [92]. C'est vers le 18<sup>ième</sup> jour post-fécondation, que l'on ne le retrouvera plus qu'au niveau des zones de différenciation de cartilage [74, 86, 93]. De plus, *Sox-9* et *Col2a1* présentent des différences d'expression dans certains tissus. Il serait donc raisonnable de penser que *Sox-9* n'est pas nécessaire pour l'expression, ni pour le maintien de l'expression de *Col2a1*, ce qui implique que *Sox-9* travaille probablement en synergie avec d'autres protéines, entre autres *L-Sox-5* et *L-Sox-6* [84, 86, 94]. Pour le cas qui nous intéresse, c'est la caractérisation de l'expression de *Sox-9* au niveau des membres qui est primordiale à définir, car la

\* voir Lexique



régénération des membres constitue aussi une « reformation » de tous les tissus présents au niveau du membre et surtout des os et du cartilage.

De même, il n'est pas abstrait de faire un lien entre les mécanismes responsables de la formation des os et du cartilage lors du développement de la patte et ceux qui prévalent lors du processus de régénération du membre chez les vertébrés. En effet, il est connu que lors de sa formation, le membre maintient une zone de progression qui est composée en très grande majorité de cellules non-différenciées en prolifération, ce qui peut se comparer avantageusement aux stades de dédifférenciation et de prolifération auxquels sont soumises certaines cellules lors de la régénération du membre de l'axolotl [9, 70].

Des études ont été menées afin de définir l'expression de *Sox-9* lors du développement des pattes chez la souris. C'est Wright *et al.*, le premier, qui, à l'aide de la technique d'hybridation *in situ* sur des spécimens complets d'embryons de souris, a décrit l'expression de ce gène lors du développement embryonnaire des membres [74]. Voici comment il dépeint la situation : « une expression abondante de *Sox-9* devient apparente au niveau de la condensation dans le bourgeon du membre entre les jours 10 et 10,5 après la fécondation ». L'expression s'étendra ainsi à toutes les structures cartilagineuses du membre en formation, jusqu'au 13<sup>ième</sup> jour après la fécondation où l'expression du gène sera confinée dans le bout des doigts de l'animal à un endroit où la chondrogénèse n'est pas encore terminée [74]. Ng et son équipe, deux ans plus tard, reprennent la même technique tout en utilisant aussi des coupes d'embryons, ils en tirent les mêmes conclusions que Wright *et al.* (1995) au niveau de l'expression de *Sox-9* qui tend à diminuer plus le membre avance dans son développement [86]. L'équipe de Hurle (2003), a fait une bonne description de l'expression de *Sox-9* lors du développement de la patte chez les embryons de poulet à différents stades. Il en ressort que *Sox-9* a un patron d'expression segmenté contrairement aux autres gènes *Sox* étudiés qui démontrent des patrons plus continus et qu'il est l'un des plus précoce. En effet, il semble que *Sox-9* soit présent dans le mésenchyme du bourgeon du membre; son domaine d'expression se sépare, un peu plus tard, en deux pour former les domaines zeugopodiaux\*. Ensuite, il y a apparition des domaines digitaux\*, stylopodiaux\* et tarsiaux\*. Mais tout comme Wright *et al.* et Ng *et al.* l'avaient remarqué, Hurle *et al.* remarque qu'au stade 29 du développement de l'embryon de poulet (stade avancé), l'expression des *Sox* devient séquestrée au bout des phalanges qui sont encore en différenciation [95]. Healy *et al.*, en 1999, avait fait lui aussi ses expériences sur les pattes de poulet et arrivait aux mêmes conclusions que Hurle *et al.*, cependant il a poussé un peu

\* voir Lexique

plus loin son investigation en causant une surexpression de *Sox-9* dans les pattes en développement. Ses expériences résultent en une grande variété de phénotypes, le moindre étant un épaississement et un raccourcissement des os, le plus sévère étant l'addition de formations cartilagineuses et l'hypersegmentation de certains doigts [85]. D'autres expériences ont aussi démontré la nécessité de *Sox-9* dans le processus de chondrogénèse chez d'autres organismes comme le poisson-zèbre [96]. De plus, *Sox-9* est impliqué dans les phénomènes de formation des axes du membre en développement. Il apparaît donc plus que probable que *Sox-9* soit impliqué, soit pour son rôle dans la formation du cartilage ou/et pour celui qu'il possède dans la détermination axiale, lors de la régénération des membres. *Sox-9*, bien que ce gène possède toutes les caractéristiques pour être le joueur primordial lors de la régénération osseuse, est mis en présence d'autres gènes qui semblent eux aussi posséder des caractéristiques intéressantes au point de vue du développement/formation des structures osseuses, parmi ceux-ci on retrouve *PTHrP*.

## 1.7 PTHrP

Le gène *PTHrP* a été pour la première fois identifié chez l'humain alors que des chercheurs essayaient de découvrir le facteur humoral circulant qui, lors d'un cancer, cause une hypercalcémie humorale maligne. Cette augmentation anormale de calcium sanguin est une complication très commune de carcinome pulmonaire qui peut être mortelle ou causer de très graves séquelles. Il semble que cette hausse de calcium soit due à une résorption osseuse plus importante de même qu'à une baisse de l'excrétion de celui-ci par le rein [97]. Comme le rôle de l'hormone de la parathyroïde (*PTH*) est de réguler le remodelage osseux et l'homéostasie calcique, elle a été tout de suite pointée du doigt en impliquant une production ectopique de celui-ci [98]. Mais les trois équipes de chercheurs qui ont travaillé sur ce cas en 1987, ont découvert simultanément que ce n'est pas *PTH* le responsable de cette hypercalcémie, mais bien *PTHrP* (*parathyroid hormone related peptide*) une protéine ubiquitaire [98-100]. Le gène de *PTHrP*, chez l'humain, est situé sur le bras court du chromosome 12, son ADN complémentaire contient environ 600 paires de bases et il est considéré comme un gène transcriptionnellement complexe [97, 101]. En effet, le *PTHrP* humain possède neuf exons, il utilise au moins trois promoteurs lors de la transcription de ses ARN messagers et par le processus d'épissage alternatif de ces mêmes ARN messagers,

il forme trois isoformes de la protéine (139, 141 et 173 acides aminés) [101]. Chez la souris et le rat, seulement un isoforme est formé [102, 103] et chez le poulet, ce sont deux isoformes qui sont traduits [101]. Malgré ces variations au niveau de la traduction, il existe une grande homologie de séquence de cette protéine entre les différentes espèces et isoformes; certaines portions sont plus conservées que d'autres, c'est le cas pour la séquence du peptide signal [97]. Comme un peptide signal implique la traduction d'une protéine immature, *PTHrP* est traduite sous forme de prohormone qui se retrouve en transit dans le cytoplasme en attendant sa prise en charge par le réticulum endoplasmique. De là, elle subira plusieurs clivages endoprotéolytiques et des glycolysations ce qui aura pour effet de produire toute une famille de protéines matures [97, 104]. Ces protéines seront ensuite exocytées vers le milieu extracellulaire pour qu'elles puissent y accomplir leurs nombreux rôles en tant que facteur autocrine, paracrine et aussi endocrine [101]. Il a aussi été prouvé récemment que *PTHrP* possède aussi une action intracrine, en effet, le propeptide naissant possède une séquence très conservée qui est en fait un signal de localisation nucléaire (SLN). Lors d'expériences en culture cellulaire, il a été prouvé que cette séquence était nécessaire et suffisante pour que *PTHrP* se retrouve au niveau du nucléole : un sous-compartiment du noyau [105-107]. Mais généralement, *PTHrP* se retrouve dans le milieu extracellulaire où il exerce une influence autocrine ou paracrine. C'est grâce à une portion de séquence homologue à *PTH* qu'il peut se fixer aux récepteurs de *PTH* (*PTHr1*). Ce récepteur est une glycoprotéine de 80 kDa qui possède sept domaines transmembranaires et est lié à une protéine Gas [108, 109]. Lorsque *PTHrP* vient se lier via son extrémité amino-terminal à *PTHr1*, celui-ci active l'adénylate cyclase et la phospholipase C, ce qui entraîne une augmentation d'AMP cyclique et de protéine kinase C pour engendrer une élévation de calcium intracellulaire [109-112].

C'est par ces mécanismes d'action que *PTHrP*, malgré sa faible concentration, se retrouve impliqué dans plusieurs fonctions biologiques [97, 109, 113]. Il est reconnu, entre autres, pour être un relaxant des muscles lisses (système circulatoire, système gastro-intestinal), un régulateur de transport calcique transépithélial (néphron, glande mammaire, placenta) et est un facteur de croissance, de différenciation et de développement embryonnaire [97]. La fonction de *PTHrP* qui nous intéresse le plus est celle l'impliquant dans la régulation du développement et de la résorption osseuse.

*PTHrP* est une protéine qui possède différentes formes matures, elle peut donc accomplir plusieurs fonctions au niveau des os et du cartilage. Elle peut faciliter ou inhiber

la résorption osseuse, elle semble essentielle dans le processus de différenciation, de polarité et de maturation des chondrocytes [114], elle est capable de stimuler la différenciation et la prolifération des ostéoblastes [111] de même qu'augmenter la synthèse du collagène fœtal. De plus, elle semble être capable de retarder l'invasion par les vaisseaux sanguins du cartilage juste avant l'ossification, pour permettre une période plus longue de croissance de l'os [97, 115]. C'est très tôt au cours du développement embryonnaire que l'expression de *PTHrP* apparaît dans les tissus musculo-squelettiques. Dans le processus d'ossification endochondrale, il est détectable aussitôt que le mésenchyme immature commence à se condenser au niveau de la colonne vertébrale et des bourgeons de membres [97]. On peut le voir aussi très clairement exprimé dans les zones de développement des doigts où le cartilage *primordia*\* est présent. Il restera présent tout au long du processus d'ossification et même lorsque les ostéoblastes apparaîtront [116]. Une des preuves les plus solides sur l'implication de *PTHrP* lors de ce processus est la mutation nulle du gène chez l'embryon de souris. Les animaux homozygotes pour la mutation sont non-viables, dû à des complications respiratoires résultant d'une mauvaise constitution du squelette [101]. En effet, les seuls phénotypes que l'on peut observer chez ces animaux, sont le raccourcissement des os, une plus grande minéralisation des os que la normale et une dysplasie du squelette en général [101]. Cette absence de phénotype ailleurs que sur le squelette est probablement due à la compensation du manque de *PTHrP* par *PTH* qui peut, tout comme *PTHrP*, se fixer sur le même récepteur et ainsi engendrer les mêmes conséquences physiologiques ou encore permettre une activation constitutive élevée des récepteurs *PTHRI* [97, 110, 115]. Mais il ne faut surtout pas oublier que *PTHrP* n'est pas le seul responsable du processus d'ossification, il est en fait au centre d'une cascade de molécules (*PTH*, *TGF-β*, *BMP*, *FGF*, collagène, *Ihh*, *Shh*, *Sox-9*) ayant toutes leurs propres fonctions [92, 117-119].

Ainsi, il ne serait pas inapproprié de considérer *PTHrP* comme l'un des principaux acteurs lors du processus de la régénération. En effet, *PTHrP* agit au niveau de la différenciation et de la prolifération des chondrocytes chez l'embryon [114], il serait fort probable que ce gène ait une fonction lorsque la dédifférenciation est terminée et qu'il faille maintenant octroyer une destinée aux cellules. Ainsi, *PTHrP* pourrait être l'élément régulateur de la partie cartilage/os de la régénération du membre, en commandant la différenciation de certaines cellules pluripotentes en chondrocytes et par le processus normal de maturation en venir à la formation des éléments squelettiques du membre en

\* voir Lexique

régénération. Bien sûr, *PTHrP* ainsi que *Sox-9* sont des éléments régulant de très près les éléments cartilagineux du membre en formation et peut être ceux du membre en régénération, mais que se passe-t-il plus tard lorsqu'il est temps pour le squelette de remplacer tout ce cartilage par de l'os? Pour répondre à cette question, il en va de soi de se pencher sur l'un des éléments essentiels de la différenciation et maturation des ostéoblastes, *Cbfa-1*.

## 1.8 Cbfa-1

*Cbfa-1* (*core binding factor  $\alpha 1$* ) est un facteur de transcription qui appartient à la famille de gènes portant des domaines *Runt*, domaine régulateur très conservé qui a été caractérisé pour la première fois chez la *Drosophile* [120]. Cette famille comprend trois gènes : *Cbfa-1*, *Cbfa-2* et *Cbfa-3*, identifiés en 1993 par deux groupes, celui de Bae et celui d'Ogawa [121-123]. Ces gènes possèdent plusieurs appellations dans la littérature, *Pebp2aA*, *B* et *C* (*Polyomavirus enhancer core binding protein  $\alpha$* ), *AML* (*acute myelocytic leukemia*), *Osf* (*Osteoblast-specific cis-acting element*) ou encore *Runx 1*, *2*, *3* (*Runt domain*) [77, 122-124]. Pour simplifier cette nomenclature, nous utiliserons l'appellation *Cbfa*. On retrouve le gène de *Cbfa-1*, chez l'humain, sur le bras court du chromosome 6 [125]. Le gène *Cbfa-1* possède une séquence d'ADN complémentaire d'environ 1,8 kilopaires de bases et un cadre de lecture ouvert codant pour 451 acides aminés [122, 123]. Cette séquence traduit la protéine *Cbfa-1*, dont le poids est de 48,6 kDa [125]. *Cbfa-1* est une protéine qui se lie à l'ADN via son domaine *Runt* sur une séquence consensus et son hétérodimérisation avec sa sous-unité  $\beta$ , *CBF $\beta$* , à pour effet d'augmenter son affinité pour l'ADN [123]. Cette liaison à l'ADN transactive le processus de la transcription [121]. Il a été prouvé que la mutation hétérozygote du gène *Cbfa-1* est suffisante pour causer la dysplasie cleidocraniale (CCD), une maladie héréditaire du squelette qui se traduit par le nanisme et une altération de la forme, de la taille et du nombre de certains os [126]. En fait, la maladie découle d'un mauvais fonctionnement du processus d'ossification endochondrale et intramembranaire. Une mutation des deux allèles du gène de *Cbfa-1*, produit un animal qui meurt de défaillance respiratoire juste après la naissance et qui démontre une absence totale d'os, mais on dénote tout de même un squelette cartilagineux à peu près normal [77]. En effet, l'une des principales fonctions découvertes à ce jour du

gène *Cbfa-1* est qu'il est essentiel, mais pas suffisant, à la différenciation de cellules de la lignée ostéoblastique, à la différenciation/maturation des chondrocytes et ainsi à la formation des os durant le développement du squelette [127-130]. Mundlos *et al.*, en 1997, a aussi soulevé l'hypothèse que *Cbfa-1* pourrait également être impliqué dans certains processus de positionnement lors du développement embryonnaire [126]. De plus, il a été démontré qu'il est un régulateur important de la transcription de certains gènes, via une action sur leur promoteur, gènes dont le rôle lors de l'ossification est incontesté: l'ostéopontine, l'ostéocalcine, sialoprotéine de l'os, le collagène type I et *Mmp13* (matrix metalloprotease) [77, 124, 131, 132]. D'ailleurs Karsenty, en 2000, décrit *Cbfa-1* comme le seul produit de gène qui régule le degré de déposition de matrice osseuse, prédisant donc une implication dans la formation de l'os post-embryonnaire [133]. Les principaux régulateurs de *Cbfa-1* semblent être quelques membres de la famille des *Bmp* qui induisent l'expression des ARN messagers de *Cbfa-1* au niveau du noyau ainsi que certaines hormones et possiblement quelques cytokines\* [124, 129]. Il est maintenant plus facile de comprendre pourquoi *Cbfa-1* est considéré comme une molécule-pivot lors du processus de formation de l'os et son expression lors du développement embryonnaire apporte une preuve de plus [129].

En fait, on peut détecter, chez la souris, l'expression de *Cbfa-1* aussi tôt que 9,5 jours post-fécondation; à ce moment, on peut l'observer au niveau du mésenchyme à partir duquel se formeront les os de l'épaule. À partir du 13<sup>ième</sup> jour post-fécondation, on peut observer une expression généralisée de *Cbfa-1* au niveau du squelette en développement [127]. Otto *et al.*, ont observé que l'expression de *Cbfa-1* précédait de quelques jours le processus menant à la différenciation des ostéoblastes, une preuve supplémentaire de son implication lors de ce mécanisme [127]. Kim *et al.*, en 1999, ont fait une étude détaillée de l'expression de *Cbfa-1* lors du développement du membre chez la souris. Ils ont observé l'expression à 12,5 jours dans l'enveloppe périchondriale des os longs du membre. À partir de ce moment, l'expression s'étend vers les régions où l'on retrouve des chondrocytes pré-hypertrophiques et ensuite aux régions hypertrophiques. Plus tard, on retrouve aussi cette expression au niveau de la zone de prolifération de l'os. Il faut cependant ajouter que, pendant tout ce temps, l'expression de *Cbfa-1* reste toujours très forte au niveau des cellules ostéoblastiques [134]. Tout comme *Sox-9* et *PTHrP*, *Cbfa-1* semble impliqué de très près lors du processus de développement du membre.

\* voir Lexique

En effet, son implication dans des processus aussi précoces que la condensation du mésenchyme, en fait une cible de choix pour l'étude du processus de régénération osseuse lors de la repousse du membre [134]. De plus, il est impliqué dans les processus essentiels de différenciation des chondrocytes et ostéoblastes, processus que l'on se doit de considérer lors de la régénération osseuse du membre [127, 128]. Kim *et al.* ont démontré que l'on retrouve *Cbfa-1* au niveau de la zone de croissance des os longs, lors de la régénération on retrouve aussi une zone de croissance osseuse dans le membre. *Cbfa-1* pourrait être l'un des principaux régulateurs du mécanisme d'ossification inclus lors du processus de régénération du membre chez l'axolotl [134].

Les trois gènes présentés plus haut sont tous de très bons candidats pour jouer un rôle lors du processus de régénération osseuse chez l'axolotl, mais leurs réelles fonctions dans ce processus restent encore à déterminer. Il est donc important d'en connaître un peu plus sur ces gènes pour déterminer si oui ou non ils sont impliqués lors du processus de la régénération du membre chez notre modèle, l'axolotl. Pour ce faire, il faut cloner ces trois gènes chez cet espèce, car c'est un modèle très peu utilisé pour les recherches en biologie moléculaire. Il faut ensuite caractériser, autant temporellement que spatialement, l'expression de ces gènes lors du processus de la régénération du membre chez l'axolotl. Une recherche à plus long terme aurait pour but de déterminer si ces gènes sont essentiels ou non au processus de la régénération. La régénération du membre reste encore un phénomène très peu documenté au niveau moléculaire, par contre, les processus de guérison semblent beaucoup mieux compris à l'heure actuelle. L'amputation d'un membre implique un traumatisme pour tous les tissus qui se trouvent à proximité du site d'amputation, les os sont eux aussi touchés par cette action. Le même phénomène se reproduit lorsque l'un des os du membre se fracture.

## 1.9 Régénération vs guérison osseuse

La régénération est un processus qui implique une certaine part de guérison au niveau du site d'amputation. En effet, au site d'amputation, il se produit, une migration de cellules qui sont généralement des kératinocytes, ceci est un processus par défaut chez tous les vertébrés [48]. Cette migration n'a qu'un seul but : fermer au plus vite cette entrée sur le milieu intérieur. L'axolotl et les autres vertébrés forment un épithélium de guérison, cette

couche cellulaire constitue la première barrière contre les attaques venant de l'extérieur. Mais, contrairement aux autres vertébrés, l'axolotl ne se constitue pas de membrane basale au site de guérison, elle laisse plutôt une zone d'échange entre l'épithélium de guérison et le mésenchyme sous-jacent [48]. C'est probablement pour cette raison que l'axolotl ne forme jamais de cicatrice lorsqu'il subit une blessure, il constitue un modèle de guérison parfaite [48]. Comme pour une blessure normale, il y aura activation de certaines enzymes, remodelage de la matrice extracellulaire et invasion des tissus environnants par les cellules inflammatoires qui s'occupent de nettoyer les débris cellulaires [48]. D'ailleurs, au site d'amputation, on retrouve les mêmes gènes qui sont exprimés lors d'une blessure chez les autres mammifères: tels  $TGF\beta$  et les *BMPs* [31]. Tout comme les autres tissus avoisinants le site d'amputation, l'os subit aussi des dommages et perd souvent une grande partie de sa masse. Les os et le cartilage ont été peu étudiés lors de la régénération, mais il est tout de même connu que ceux-ci, tout comme le reste du membre, régénèrent parfaitement. Phénomène encore inexpliqué, les chondrocytes cessent leur synthèse de collagène durant la formation du blastème [135]. Les processus qui sous-tendent ces étapes critiques de la régénération des structures osseuses du membre sont encore inconnus. L'amputation d'un membre représente pour le restant du corps une structure manquante dans sa totalité, par contre une fracture jointe ou une fracture non-jointe ne représente qu'une partie du membre qui est absente ou affectée. Plusieurs études existent sur les processus de réparation osseuse chez la plupart des vertébrés et une très bonne caractérisation de ces phénomènes en découle [136-140].

Il existe deux catégories de fractures décrites à ce jour, les fractures jointes et les fractures non-jointes de dimension critique (*gap* osseux). Dans le cas des fractures jointes, elles peuvent être de deux types : soit stabilisées par des interventions de nature médicales (plâtres ou tiges métalliques) ou encore non-stabilisées. Dans le cas de fractures non-stabilisées, la guérison osseuse, contrairement aux fractures stabilisées, sera souvent imparfaite accompagnée de la formation d'un gros cale (équivalent d'une cicatrice de l'os) due à une accumulation plus importante de cartilage [141]. De plus Le *et al.* (2001), dans son étude chez la souris, a remarqué une différence d'expression de certains gènes comme *Ihh* et *Bmp-6* pour ces deux types de fractures [141]. Pour ce qui est des fractures non-jointes, elles sont le plus souvent provoquées intentionnellement par interventions chirurgicales. Pour ce type de fracture, il existe une manière de la caractériser, c'est la dimension critique. La dimension critique est la longueur maximale que doit avoir l'explant



d'os pour que la reformation d'un cale soit possible. Si la longueur critique est dépassée, il est impossible d'obtenir une guérison osseuse. Certaines molécules comme *TGF- $\beta$ 1* semblent pouvoir augmenter la longueur critique d'un explant osseux [142].

Chez la plupart des vertébrés, le processus de guérison des fractures peut se résumer en trois étapes. La première étant la réponse immédiate à la blessure, cette étape se caractérise par la formation d'un hématome (phase de coagulation) et l'envahissement des tissus environnants par les cellules de type inflammatoire et des cellules mésenchymateuses non-différenciées, la formation d'un cale externe en résulte. La deuxième étape est celle de la réparation, durant laquelle le cale externe est envahi par des chondrocytes qui sécrètent le collagène et autres molécules de structures, pour devenir le cale mou. Un peu plus tard au cours de cette phase, via un processus de calcification, le cale mou sera remplacé par le cale dur. La dernière étape du processus de guérison osseuse est celle du remodelage, c'est-à-dire que le cale dur formé jusqu'ici sera soumis à d'intenses modifications par les ostéoclastes\* pour que celui-ci ressemble à l'os du départ [73, 138, 140]. Ces étapes sont soumises à une régulation serrée par certains facteurs de croissance comme les *Tgf- $\beta$* , *Pdgf* (*platelet-derived growth factor*), *Bmp* et les *Fgf*, ces facteurs sont synthétisés par les cellules qui participent à la guérison de l'os [138, 143]. Récemment, des molécules comme *PTHrP*, *Cbfa-1* et *Ihh* ont aussi été associées au processus de guérison des fractures chez d'autres espèces [72, 73].

Chez l'axolotl, il existe quelques études portant sur le processus d'ossification durant la régénération du membre [135, 144, 145], mais encore plus rares sont les recherches portant sur les processus de guérison osseuse tous types de fractures confondus sur les membres. C'est pourquoi il est essentiel de bien caractériser autant d'un point de vue anatomique que moléculaire ces mécanismes de guérison osseuse chez l'axolotl. Pour y arriver, il faut déterminer anatomiquement le patron de développement, de guérison et de régénération osseuse de la patte de l'axolotl. Ensuite, utiliser les gènes *PTHrP*, *Sox-9* et *Cbfa-1* pour caractériser l'expression de ceux-ci lors de ces phénomènes. Et enfin, déterminer si ces mêmes gènes sont essentiels pour le déroulement du développement, de la guérison et de la régénération de la patte chez l'axolotl.

\* voir Lexique

## 2 Matériels et Méthodes

### 2.1 Entretien des axolotls

Les animaux, à différents stades de développement, nous proviennent de la colonie de l'Université d'Indiana (Bloomington, IN) aux États-Unis. Les axolotls sont maintenus dans une petite salle dont la température et la photopériode sont contrôlées automatiquement. Les animaux sont gardés à des températures variant entre 18 et 21°C et vivent selon une photopériode de 12 heures de clarté, 12 heures de noirceur (7 a.m. à 7 p.m./7 p.m. à 7 a.m.). Les axolotls baignent individuellement dans une solution saline appelée Holfreter's ( Stock : 38 mM MgSO<sub>4</sub>, 25 mM CaCl<sub>2</sub>, 23 mM KCl, 1,7 M NaCl et 9g/L de Trizma Fishgrade pH 7,4). La solution stock est diluée dans l'eau distillée à 20% pour les larves et à 40% pour les animaux plus matures. Les pots contenant les animaux sont lavés à chaque jour et les animaux sont changés d'eau par la même occasion une heure après l'alimentation. Les larves d'axolotl venant de sortir de l'œuf sont nourries avec des artémies\* (*Artemia sp.*) venant juste d'éclore. On pèse 2,5 g d'oeufs d'artémie, gardés à 4°C, on les met dans une bouteille de 1L avec 39 g de sel d'aquarium, 1ml de Pen/strep (Gibco-Invitrogen, CA) et 1L d'eau distillée. Le tout est agité avec une pierre à air dans la bouteille qui est incubée à 37°C pour la nuit (env. 20 heures). Le lendemain, on récupère les artémies selon un principe de phototactisme. Les larves plus grosses reçoivent des artémies ou encore des vers de sang congelés (BioPure, CA). Les animaux qui font plus de 20 cm reçoivent de la moulée cubée (achetée à la colonie). En cas de maladie, plus souvent des mycètes, les animaux sont traités avec un traitement antifongique (Fongus Cure, Aquarium Pharmaceuticals inc., PA).

### 2.2 Chirurgies sur les axolotls

Les animaux sont anesthésiés dans une solution de 1X ou 2X MS222 (3-aminobenzoic acidethyl ester ou methanesulfonate salts)(Stock : 2% ou 20X), selon la taille de l'animal, dont le pH a été ajusté à 7,4 avec une solution de 10 % Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>. Ils sont ensuite sortis de l'eau et déposés sur un papier absorbant imbibé de Holfreter's. Durant la chirurgie, les animaux sont constamment arrosés pour ne pas que les branchies sèchent. Il suffit ensuite

de couper, à l'aide de ciseaux à micro-chirurgie (Fine Science Tools, B.C., Canada ) la patte et ensuite de couper le bout d'os qui dépasse du site d'amputation pour ainsi permettre une régénération dans les meilleures conditions. Les animaux sont ensuite remis dans leur pot sans autre traitement.

### 2.3 Clonage des gènes d'intérêts

La première méthode que nous avons utilisée pour le clonage est celle du RT-PCR. Pour obtenir le matériel nécessaire pour effectuer cette technique, il faut, au préalable, prélever les tissus d'un animal, en extraire l'ARN totale. Pour ce faire nous utilisons une méthode utilisant le TRIzol® (Invitrogen, CA) et un homogénéisateur de type Polytron (Brinkmann Instruments, ON, Canada). Une fois le tissu homogénéisé, on extrait l'ARN totale avec le chloroforme et on la précipite avec de l'isopropanol, ces étapes sont suivies de lavages successifs avec de l'éthanol conservée à -20°C. L'ARN totale sert de substrat pour une réaction de transcriptase inverse (RT) que l'on effectue à l'aide de la Superscript II Rnase H<sup>-</sup> RT (Invitrogen, CA) de manière à obtenir de l'ADN complémentaire (ADNc) qui servira de substrat à la réaction de PCR (polymerisation chain reaction). Pour le PCR, on utilise des amorces dégénérées construites à partir de séquences d'ADNc d'autres espèces telles la souris, la tortue, l'humain, etc. Les séquences d'ADNc des différentes espèces sont alignées, à l'aide d'un programme d'alignements de séquences (MegAlign du logiciel Lasergene, DNASTar, WI). On choisit deux régions d'environ 20 acides nucléiques dans l'alignement selon les critères suivants : les régions plus conservées, celles qui ont le moins tendance à se refermer sur elles-mêmes et enfin des régions qui ont une faible concentration en C-G, afin de diminuer la température de liaison des amorces. Les deux séquences déterminées sont ensuite envoyées à Sigma Genosys (ON, Canada) pour leur synthèse. Les réactions de PCR sont faites à l'aide d'un thermocycleur (Thermo Hybaid MBS, MA) et elles comportent les éléments suivants : 10% du produit final de la réaction de RT, 1 µl de chacune des amorces de 25 µM (sens et antisens), 1X tampon de réaction, 1,5 mM MgCl<sub>2</sub>, 1µl de 10mM dNTP, compléter avec de l'eau nanopure pour un volume final de 25 ou 50µl. Les cycles sont les suivants : 95°C 5 min, 75°C 5 min, il faut à ce moment ajouter 0,4 µl de Taq polymérase (2U/ réaction) (Invitrogen, CA), suivi de trente cycles (94°C (30 sec) (température de dénaturation); 60°C (30 sec) (température de liaison

des amorces); 72°C (2 min) (température d'élongation)). On ajoute ensuite une étape d'élongation de 15 min et la réaction doit être préservée à 4°C jusqu'à la révélation sur gel d'agarose 1%, 1X TAE (50X : 1M tris base, 0,5M acide acétique glaciale, 5mM EDTA pH 8,0 dans l'eau nanopure) contenant 10µl de 10mg/ml de bromure d'éthidium pour 100 ml de gel (Invitrogen, CA). Le gel est révélé et photographié à l'aide d'un système Fluorochem<sup>TM</sup> 8900 (CA). Les bandes correspondant à la longueur du segment attendu situé entre les deux amorces, sont ensuite clonées à l'aide du kit TOPO TA cloning (Invitrogen, CA). De toutes les colonies obtenues sur milieu solide sélectif LB (luria broth) enrichi d'ampicilline, d'IPTG et de X-gal (1% Bactotryptone, 0,17 M NaCl, 0,5% extraits de levures, 0,050mg/ml d'ampicilline, 12,5 mg/ml de X-Gal (5-bromo-4-chloro-3-indolyl-β-D-galactoside), 120 µg/ml d'IPTG (isopropylthio-β-galactoside), seulement quelques colonies blanches seront inoculées dans milieu liquide LB additionné d'ampicilline pour fins d'extraction des plasmides pCR®II-TOPO® (voir annexe 1). Pour ce faire, on utilise un kit GenElute<sup>TM</sup> Plasmid Miniprep (Sigma, MO). On digère ensuite une partie des plasmides, à l'aide d'enzymes de restriction appropriées, pour sortir l'insert du plasmide. On fait ensuite séquencer les plasmides contenant les inserts de grandeur désirée par le service de séquençage du département de biochimie de l'Université de Montréal pour confirmer l'identité du fragment. Pour analyser les séquences obtenues, on utilise le programme BLAST à l'intérieur du site PubMed.

La deuxième méthode utilisée pour cloner les séquences des gènes d'intérêts est le criblage d'une librairie d'ADNc de larves d'axolotls (Stratagene, La Jolla, CA)(voir le protocole pour des explications plus complètes). Les cellules infectées par le phage Uni ZAP® XR sont des XL1-Blue MRF' forment des plages de lyse sur une gélose NZY 150 mm (85 mM NaCl, 8 mM MgSO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O, 0,5% extraits de levures, 1% de caséine hydrolysée). Des membranes de nitrocellulose NitroPure (Osmonics, Fisher, US) sont ensuite appliquées sur les géloses et les ADN sont liés à la membrane par U.V. à l'aide d'un crosslinker SpectroLinker (Spectronics Corporation, NY). Ces membranes sont ensuite préhybridées dans un four à hybridation (VWR Scientifics Products, PA) à l'aide d'une solution contenant ou non de la formamide et contenant des agents bloquants et autres composés (Denhart's (2% Ficoll, PPD, BSA), sperme de saumon ou hareng dénaturé, dextran sulfate, tampon sodium-phosphate, ARN de levure, EDTA, SSC, SDS, etc.). On synthétise ensuite une sonde d'ADN marquée au phosphore 32 à l'aide d'un bout de séquence du gène dont on veut la séquence complète, de dNTP et du grand fragment de

l'ADN polymérase I (Invitrogen, CA) qui synthétise des fragments marqués. On purifie cette sonde et on la met sur les membranes dans la solution de préhybridation, on incube toute la nuit dans le four à hybridation. Après quelques lavages avec une solution de 0,1X SSC et 0,1% SDS, on emballe les membranes dans une pellicule plastique type Saran Wrap et on les place dans une cassette pour l'exposition d'un film radiographique B-Plus (Progene, Canada) à -80°C. Le film est développé à l'aide d'une machine de type X-OMAT Processor (Kodak, Canada). Les plages positives seront ensuite prélevées et stockées dans une tampon SM (100mM NaCl, 8mM MgSO<sub>4</sub>, 50mM Tris-HCL pH7,5, 0,01% gélatine) où elles seront utilisées pour un criblage secondaire des plages positives. Après avoir isolé une plage positive, on utilise un protocole d'excision (Stratagene, CA) pour sortir la séquence du phage spécifique des bactéries. Les colonies positives seront ensuite soumises à une extraction de leur plasmide (Miniprep) qui est pBluescript SK (+) (voir annexe 1), une digestion et un séquençage.

La troisième méthode : RACE (Rapid Amplification of cDNA Ends) que nous avons utilisée était destinée à trouver la séquence complète de nos gènes d'intérêt. Nous avons effectué cette méthode à l'aide du kit GeneRacer (Invitrogen, CA). Le processus implique une étape de déphosphorylation des ARN totale ou des ARNm, une étape qui retire la coiffe des ARNm, une étape de ligation d'un oligo sur l'ARN, une réaction de transcriptase inverse et enfin deux rondes d'amplification par PCR à l'aide d'amorces spécifiques. On effectue ensuite une réaction de clonage à l'aide du kit TOPO TA (Invitrogen, CA). On purifie les plasmides des colonies positives (Miniprep), ils sont digérés et séquençés.

## **2.4 Caractérisation temporelle de l'expression des gènes d'intérêt par Northern Blot**

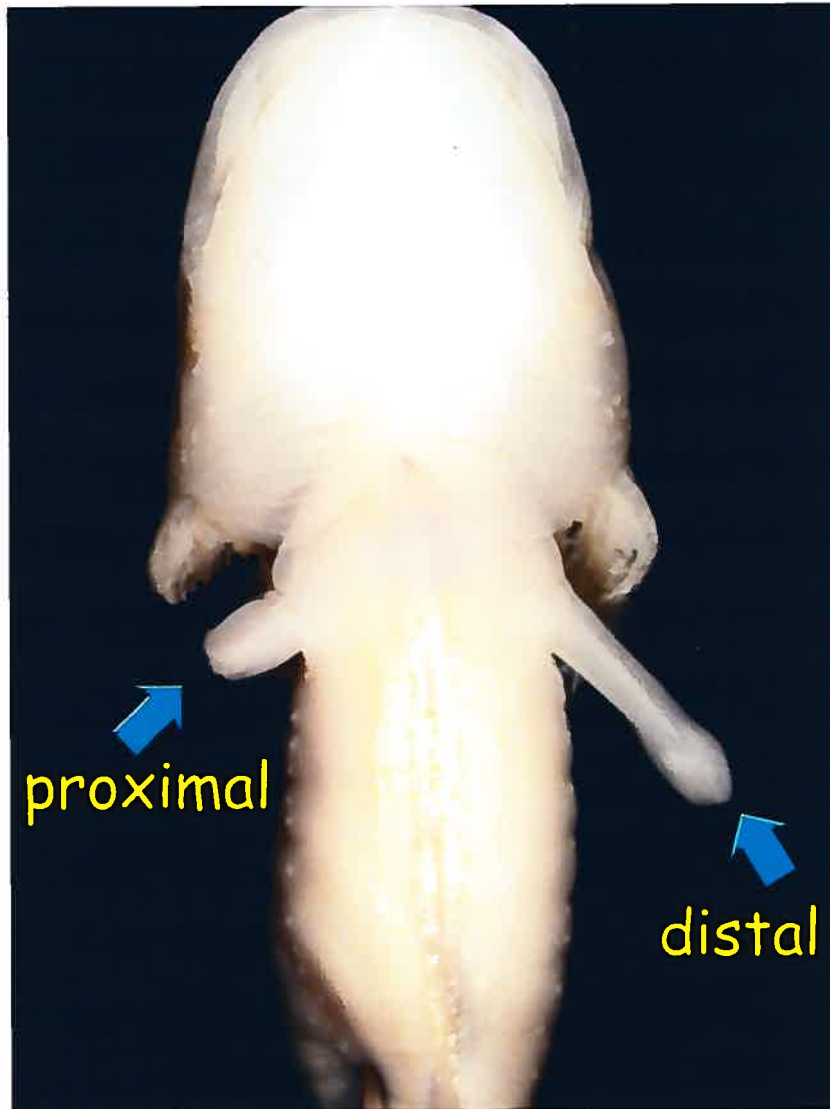
Pour effectuer cette expérience, nous avons utilisé l'analyse Northern. Il faut tout d'abord prélever les blastèmes aux différents stades de régénération de la patte. Pour ce faire, il faut anesthésier l'animal et prélever un morceau de la patte en régénération correspondant au blastème plus 2 mm sous le site d'amputation. Les blastèmes sont ensuite congelés dans l'azote liquide et gardés à -80°C en attendant d'en extraire l'ARNt à l'aide de la technique décrite plus tôt. Lorsque l'on a extrait l'ARN totale, il faut ensuite extraire les ARNm à l'aide du kit GeneElute<sup>TM</sup>- mRNA Miniprep (Sigma, MO). À toutes les étapes d'ARN est vérifié (gel d'agarose et lecture au spectrophotomètre). Toutes les lectures au

spectrophotomètre BioMate™ 3 (Thermo Spectronic, NY) se font de la même façon. On dilue, tout d'abord, ce que l'on veut quantifier dans un tampon TE pH 8,0 (10mM Tris, 1mM EDTA), on met ensuite l'échantillon dans des cuvettes de quartz 50µl (VWR, PA). Les échantillons sont lus à des longueurs d'ondes de 260 et 280 nm. Les ARNm étant extraits, il faut prendre 5 µg de cette ARNm pour chacun des stades et les charger sur un gel dénaturant. Le gel est composé de 1% agarose, 1X MOPS (Stock 10X : 250mM MOPS (3-(N-Morpholino) propanesulfonic acid), 50mM acétate de sodium, 10mM EDTA) et 6,9% formaldéhyde. Lorsque les échantillons auront migré dans le gel toute la nuit, on effectue un transfert des ARNm du gel vers une membrane de nylon Biodine® A (Pall, ON, Canada) à l'aide d'une unité de transfert capillaire (Scie-Plas ltd, UK) dans un tampon 2X SSC (20X : 3M NaCl, 0,34M sodium citrate). On laisse transférer toute la nuit, le jour suivant on liera les ARNm à la membrane à l'aide d'un crosslinker SpectroLinker (Spectronics Corporation, NY). On hybride ensuite la membrane à l'aide d'une sonde marquée au phosphore 32 que l'on synthétise de la même manière que la sonde du criblage de la librairie d'axolotl (voir plus haut). Il faut cependant utiliser de l'eau traitée au DEPC (diéthyl pyrocarbonate) pour toutes les étapes puisqu'il s'agit d'ARN, le DEPC a pour effet d'inactiver les RNases qui pourraient se retrouver dans l'eau et dégrader l'ARN du gel ou de la membrane. La membrane est ensuite lavée dans deux solutions (solution 1 : 2XSSPE (3M NaCl, 0.2M Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 20mM EDTA), 0,1% SDS ; solution 2 : 0,5X SSPE, 0,1% SDS), elle est ensuite emballée dans une pellicule plastique et elle est exposée à un film radiographique quelques jours à -80°C. Le film est ensuite développé dans la machine X-OMAT (Kodak, Canada).

## 2.5 Caractérisation spatiale de l'expression des gènes d'intérêt

Une caractérisation du patron d'expression des gènes est obtenue grâce à une technique d'hybridation *in situ* sur des pattes entières en régénération [154]. Cette technique contrairement aux techniques conventionnelles d'hybridation *in situ*, nous permet de visualiser en trois dimensions l'expression du gène à l'étude, ce qui en fait un outil très utile lors des études de régénération. Il faut tout d'abord amputer des animaux de moins de

**Figure 2 :** Amputation proximale et distale. Vue ventrale de l'axolotl.





cinq centimètres, sur le côté droit on ampute proximal par rapport au corps, c'est-à-dire environ au milieu de l'humérus/fémur, et les deux pattes du côté gauche sont amputées distalement donc au milieu des deux os radius/cubitus ou tibia/fibula (figure 2). On laisse les pattes régénérer jusqu'au stade désiré et on fixe les animaux euthanasiés en entier aux différents stades. La fixation est effectuée dans le 1XMEMFA ( 10% sels MEM (1M MOPS pH 7.4, 20mM EGTA, 10mM MgSO<sub>4</sub>), 3,7 % formaldéhyde et le reste en eau traitée au DEPC). On laisse ensuite l'animal dans le fixateur à 4°C durant deux jours, on change ensuite le fixateur pour du méthanol, on laisse stabiliser quelques minutes, on remet du méthanol et on garde les animaux fixés à -20°C. Il faut ensuite préparer la sonde d'ARN antisense qui s'hybridera sur les ARNm des gènes à étudier. On linéarise le plasmide dans lequel notre gène est inclus, on purifie sur gel le plasmide linéaire, on prélève 1µg du plasmide purifié et on fait une réaction de transcriptase à l'aide d'une polymérase à ARN (T3, T7, SP6) qui synthétisera une sonde antisens marquée à la digoxigénine. Cette sonde, par un traitement à la DNase I ne contiendra plus d'ADN et sera ensuite précipitée. À la fin de ce processus, nous obtiendrons une sonde 10X que nous utiliserons diluée 1X.

Les pattes des animaux fixées sont prélevées et nettoyées des tissus non-désirés (entre les deux pattes), elles subiront ensuite une série de traitement : réhydratation, traitement à la protéinase K (30µg/ml), acétylation (0,1M triéthanolamine et acide acétique anhydre), refixation (4% paraformaldéhyde) et préhybridation. La solution que nous utilisons pour la préhybridation est la même que pour diluer la sonde 10X. Elle se compose comme suit : 50% formamide, 5X SSC, 1mg/ml ARN de levure, 100µg/ml héparine, 1X Denhart's, 0,1% Tween-20, 0,1% CHAPS et 5 mM EDTA. On préhybride donc toute la nuit à des températures variant entre 55°C et 65°C. Le lendemain, on dénature la sonde diluée 1X à 83°C durant 2 minutes et on incube la sonde d'ARN antisens avec les pattes durant deux à trois jours à 65°C (*PTHrP*) et 60°C (*Sox-9*, *Cbfa-1*). On fait ensuite des lavages post-hybridation avec du SSC et du MAB (100mM acide maléique, 150mM NaCl, pH 7,5). Vient ensuite l'étape de l'immunohistochimie, qui consiste à mettre les pattes hybridées en présence d'agents bloquants comme l'albumine de sérum bovine et le sérum de mouton. On ajoute ensuite l'anticorps qui reconnaît la digoxigénine, cet anticorps est couplé à l'alkaline phosphatase. On met ensuite le BM purple (Roche,Mtl., Canada) qui se verra enlever un groupement phosphate par l'alkaline phosphatase, ce qui a pour résultat de changer le BM purple en précipité violet aux endroits où il y aura présence de la sonde,

donc du gène exprimé. Cette technique est très révélatrice, mais comporte plusieurs étapes que l'on doit optimiser (pénétration de la protéinase K, température d'hybridation)

Pour étudier le processus de guérison des fractures jointes et non-jointes, il faut d'abord faire les chirurgies qui permettent d'imiter les atteintes que peut subir l'os lors de tels phénomènes. La fracture jointe est pratiquée sur un animal qui a été anesthésié avec 2X MS222. On fait une incision longitudinale antérieure de la peau sur la patte au niveau de l'avant-bras, on repère l'un des deux os de la partie distale de la patte (radius/cubitus, tibia/fibula), on sectionne ensuite, à l'aide de ciseaux chirurgicaux, l'un des deux os en son milieu. Les deux extrémités d'os sont ensuite remis en ligne et l'animal retourne dans son pot sans aucune stabilisation de la fracture. La fracture non-jointe est effectuée suivant le même principe, à l'exception près que lorsque l'on vient pour couper l'un des deux os de la partie distale de la patte, on coupe une première fois plus près des os du tarse. On mesure ensuite 4 mm (dimension critique) et on recoupe dans la partie de l'os plus proche du coude, on extrait ensuite la partie d'os enlevée et on remet l'animal dans son pot. Encore une fois, pour ce type de chirurgie, aucune stabilisation de la patte de l'animal n'est effectuée.

## **2.6 Fixation et coloration des pattes fracturées**

Les pattes ainsi fracturées sont amputées à différents temps suivant la chirurgie. Les pattes sont fixées, 24 heures ou plus, dans une solution de 10% formaline tamponnée (4% formaldéhyde, 0,7X PBS) jusqu'à ce qu'elles soient colorées. Pour ce faire, on utilise une technique de coloration double pour colorer le cartilage en bleu et la matrice calcifiée en rouge [77, 85]. La technique est simple, il faut d'abord rincer le fixateur au moins une heure avec de l'eau distillée en effectuant plusieurs changements d'eau durant ce temps. On place ensuite le spécimen dans la solution colorante au bleu d'alcan (20 mg de poudre de bleu d'alcan dans une solution EtOH/acide acétique glaciale de 70% éthanol et 30% acide acétique glaciale) pour une journée au minimum. Cette étape permet de teindre le cartilage en bleu. Le lendemain, on transfère le spécimen dans la solution EtOH/Hac pendant une heure. On met dans l'éthanol 100% pour 24 heures. On rince ensuite le tout à l'eau du robinet, en effectuant plusieurs changements, sur une période de deux jours. On transfère ensuite le spécimen dans une solution de 1% trypsine diluée dans une solution de 30% de

borate de sodium (Borax) saturée. On laisse agir la trypsine, à température de la pièce, durant au moins 24 heures, si au bout de ce temps la coloration bleue n'est pas encore visible, changer la trypsine et laisser pour une autre période de 24 heures. On transfère ensuite dans la solution colorante au rouge d'alizarin. Pour faire celle-ci, on dissout la poudre du rouge alizarin dans de l'eau de manière à ce que celle-ci soit saturée. Pour l'utiliser lors du protocole, on prend une solution de 0,5% KOH et on ajoute de la solution saturée de rouge alizarin jusqu'à ce que celle-ci prenne une teinte violet très foncé. On met ensuite la patte dans cette solution durant 24 heures. On transfère les pattes dans une solution de 0,5% KOH sans rouge alizarin et on change deux ou trois fois sur une période de 24 heures. On traite ensuite les pattes avec des solutions 0,5% KOH/glycérol: 2 : 1, 1 : 1, 1 : 2 et finalement on conserve les pattes dans du glycérol 100%, ce qui permet une conservation prolongée des spécimens, jusqu'à la prise de photos.

### 3 Résultats

Afin de faciliter la présentation et l'analyse des résultats obtenus, l'étude se fera selon l'ordre établi dans la section Revue de littérature, soit : *Sox-9*, *PTHrP* et *Cbfa-1*. Toutes les expériences des études d'expression pour les trois gènes ont été menées un minimum de trois fois pour s'assurer de l'acuité du signal perçu.

#### 3.1 Sox-9

##### 3.1.1 Clonage

Il est primordial avant d'entreprendre toute étude d'expression sur le gène donné, de le cloner. Pour ce faire, la méthode de RT-PCR utilisée avec des amorces dégénérées a été privilégiée. Les amorces utilisées pour cloner *Sox-9* sont les suivantes : DFSOX (Degenerate Forward *Sox-9*) et DRSOX (Degenerate Reverse *Sox-9*) (figure 3 A), la longueur du segment attendu est de 471 paires de bases (pb). La bande réelle obtenue par électrophorèse suite au RT-PCR est d'environ 490 pb (résultats non montrés), après séquençage et analyse de la séquence avec BLAST ([www.ncbi.nlm.nih.gov/PubMed](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/PubMed)), on obtient un segment de 458 pb correspondant au gène *Sox-9* avec une valeur E (Expect) de  $3e-17$ . La valeur E est une valeur qui donne le niveau d'homologie de la séquence soumise par rapport aux autres séquences de la banque de données. La séquence clonée est sens (+/+), ce qui veut dire que le gène inséré à l'intérieur du plasmide est 5'-3' comme celui-ci. La séquence clonée possède un bon degré d'homologie, plus de 80 % (table1), avec le gène *Sox-9* des autres espèces, tels l'alligator, l'humain, la souris, etc. (figure 4).

##### 3.1.2 Études d'expression

Les études d'expression effectuées pour *Sox-9* utilisent toutes une sonde qui a été synthétisée à partir du plasmide séquencé contenant la séquence de *Sox-9*.

**Figure 3 :** Amorces dégénérées d'orientation 5'-3' utilisées pour le clonage des gènes d'intérêt. A) Amorces dégénérées utilisées pour cloner un segment de *Sox-9*. B) Amorces dégénérées utilisées pour cloner un segment de *PTHrP*. C) Amorces utilisées pour cloner un segment du gène *Cbfa-1*.

A

DFSOX      5' GAYCAGTAYCCSCAYCTGCA 3'  
DRSOX      5' TGCTSAGYTCNCCRATGTCC 3'

B

DFPTHRP    5' CAGCTVMTBCAYGACAAGGG 3'  
DRPTHRP    5' GTTNGTYTCCTGRGKYAGGT 3'

C

DFCBFA      5' ACAGYCCSAACTTYCTSTGCT 3'  
DRCBFA      5' GGTAMGWCTGRTCATASGAC 3'

Légende :

A = Adénine    C = Cytosine    G = Guanine    T = Thymine

R = A + G      Y = C + T      K = G + T      S = G + C      W = A + T

H = A + T + C    B = G + T + C    D = G + A + T    V = G + A + C

N = A + T + C + G

\*\*\*Note : la légende est constituée à partir des indications de Sigma Aldrich Genosystem, US.

**Table 1 :** Tableau comparatif des pourcentages d'homologie entre le fragment d'ADNc de *Sox-9*, *PTHrP* et *Cbfa-1* cloné chez l'axolotl et celui de l'humain, du poulet, du rat, de la souris et du xénope. Données extraites avec Blast (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/>)

		Pourcentage d'homologies de différents vertébrés avec la séquence clonée chez l'axolotl (%)				
		Humain	Poulet	Rat	Souris	Xénope
<i>Sox-9</i>	Acides nucléiques	90	95	88	87	85
	Protéines	95	95	95	95	88
<i>PTHrP</i>	Acides nucléiques	Les données pour ce gène ne sont que fragmentaires				
	Protéines	63	78	61	61	n-d
<i>Cbfa-1</i>	Acides nucléiques	81	82	87	81	85
	Protéines	95	95	95	95	88

n-d : données non-disponibles



**Figure 4 :** Alignements de la séquence clonée de *Sox-9* de l'axolotl (en jaune) avec la séquence de l'alligator, du poisson-zèbre, de l'humain, de la souris, du poulet et du xénope. L'alignement a été effectué grâce à l'algorithme Clustal W. Le domaine HMG est indiqué en vert.

1 -----GAGCAGTATCCCCACCTGC axolotl SOX9  
 352 GCGGCCCGGAGAAAGCTGGCTGACCAGTACCCCATCTGC alligator SOX9  
 358 GCGGCGCGCAGGAAGCTGGCCGACCAGTACCCGCACCTCC poisson SOX9  
 352 GCGGCGCGCAGGAAGCTCGCGGACCAGTACCCGCATCTGC humain SOX9  
 352 GCTGCGCGCAGGAAGCTGGCAGACCAGTACCCGCATCTGC souris SOX9  
 355 GCGGCTCGAAGGAAGCTGGCTGACCAGTACCCGCATCTGC poulet SOX9  
 352 GCTGCAAGGAGGAAGCTGGCTGATCAGTACCCACCTGC xenope SOX9

20 ACAWYGCCGTTCTCAGCAAGACCCTGGGAAAGCTGTGGAG axolotl SOX9  
 392 ACAACGCCGAGCTGAGCAAAACCCTGGGCAAGCTCTGGAG alligator SOX9  
 398 ACAACGCCGAGCTCAGCAAAACTCTGGGAAAACTTTGGAG poisson SOX9  
 392 ACAACGCCGAGCTCAGCAAGACGCTGGGCAAGCTCTGGAG humain SOX9  
 392 ACAACGCCGAGCTCAGCAAGACTCTGGGCAAGCTCTGGAG souris SOX9  
 395 ACAACGCCGAGCTCAGCAAGACGCTGGGCAAGCTGTGGAG poulet SOX9  
 392 ACAATGCAGAACTCAGCAAGACGCTGGGAAAGTTATGGAG xenope SOX9

60 GCTTCTGAATGAG AACGACAAGCGCCCCCTTTATAGAGGAG axolotl SOX9  
 432 GCTGCTGAACGAAAGCGAGAAGCGCCCATTCGTGGAGGAA alligator SOX9  
 438 ATTACTGAACGAGGTGGAAAAGCGTCCCTTCGTGGAGGAG poisson SOX9  
 432 ACTTCTGAACGAGAGCGAGAAGCGGCCCTTCGTGGAGGAG humain SOX9  
 432 GCTGCTGAACGAGAGCGAGAAGAGACCCTTCGTGGAGGAG souris SOX9  
 435 GCTGCTGAATGAGAGCGAGAAGCGTCCCTTCGTGGAGGAG poulet SOX9  
 432 ACTTCTGAATGAGGGTGAGAAACGCCCTTTCGTGGAGGAA xenope SOX9

100 GCCGAGCGCCT SCGTACTCGCCCAACAAGAAGGACCACCCC axolotl SOX9  
 472 GCCGAGCGGCTGCGGGTGCAGC-ACAAGAAGGACCACCCCT alligator SOX9  
 478 GCAGAGCGCCTTCGGGTGCAGC-ACAAGAAGATCACCCC poisson SOX9  
 472 GCGGAGCGGCTGCGCGTGCAGC-ACAAGAAGGACCACCCG humain SOX9  
 472 GCGGAGCGGCTGCGCGTGCAGC-ACAAGAAGACCACCCC souris SOX9  
 475 GCCGAGCGGCTGCGGGTGCAGC-ACAAGAAGGACCACCCC poulet SOX9  
 472 GCAGAGAGGCTGAGGGTCCAAC-ACAAGAAGGATCATCCC xenope SOX9

140 GATTAMAAGTACCAGCCGCGCAGGCGCAAGAATGGCAAGG axolotl SOX9  
 511 GACTACAAGTACCAGCCCCGGAGGAGAAAGTCGGTGAAGA alligator SOX9  
 517 GACTATAAGTACCAGCCCCGGCGGAGGAAGTCGGTGAAGA poisson SOX9  
 511 GATTACAAGTACCAGCCGCGGCGGAGGAAGTCGGTGAAGA humain SOX9  
 511 GATTACAAGTACCAGCCCCGGCGGAGGAAGTCGGTGAAGA souris SOX9  
 514 GACTACAAGTACCAACCACGCAGGAGGAAGACGGTGAAGA poulet SOX9  
 511 GACTACAAGTATCAGCCACGGCGCAGAA AGTCCGTTAAGA xenope SOX9

180 CCAC-- ----GACAGGAGAGGGAGA--GGTGCCGGGCGAAGGCG axolotl SOX9  
 551 ACGGGCAGTCGGAGCAGGAGGAGGGCTCGGAGCAAACCCA alligator SOX9  
 557 ACGGCCAGAGCGAATCTGAAGACGGCAGCGAACAGACCCA poisson SOX9  
 551 ACGGGCAGGCGGAGGCGAGGAGGCCACGGAGCAGACGCA humain SOX9  
 551 ACGGACAAGCGGAGGCGGAAGAGGCCACGGAACAGACTCA souris SOX9  
 554 ACGGGCAGTCGGAGCAGGAGGAGGGCTCCGAGCAGACCCA poulet SOX9  
 551 ATGGGCAGACAGAACAAAGAGGATGGTGCTGAGCAAACCCA xenope SOX9

216 -ACACGGTGCAGGGACACTACAAGAACACA-- ----CACCTG axolotl SOX9  
 591 CATCTCCCCCAATGCCATCTTCAAAGGCCCT-- ----GCAGGCG alligator SOX9  
 597 CATCTCGCCCAACGCCATCTTCAAAGCGCTCCAGCAGGCG poisson SOX9  
 591 CATCTCCCCCAACGCCATCTTCAAAGGCGCT-- ----GCAGGCC humain SOX9  
 591 CATCTCTCCTAATGCTATCTTCAAAGGCGCT-- ----GCAAGCC souris SOX9  
 594 CATCTCCCCCAACGCCATCTTCAAAGGCGCT-- ----GCAGGCG poulet SOX9  
 591 CATCTCCCCCTAATGCAATTTTCAAAGGCCCT-- ----ACAGGCT xenope SOX9

251 **GACCTGCGGCGTGCCGGCGACCG-GTCACCCATGTCTGAT** axolotl SOX9  
 628 GACTCCCCGCAGTCCTCTTCCAGCATGAGCGAGGTGCACT alligator SOX9  
 637 GACTCGC-----CCGCGTCCAGCATGGGAGAAGTGCCT poisson SOX9  
 628 GACTCGCCACACTCCTCCTCCGGCATGAGCGAGGTGCACT humain SOX9  
 628 GACTCCCCACATTCTCCTCCGGCATGAGTGAGGTGCACT souris SOX9  
 631 GACTCCCCGCAGTCATCCTCCAGCATCAGCGAGGTGCACT poulet SOX9  
 628 GACTCCCCGCATTCTCTTCCAGCATGAGCGAAGTCCACT xenope SOX9

290 **GGGGCGTCAGAAACACGGGGCAGGTCAGAGTCACGGGGCCCC** axolotl SOX9  
 668 CCCCCGGG- GAGCACT-----CTGGGCAGTCCCAAGGCCCCC alligator SOX9  
 671 CGCCAGC- GAACACT-----CAGGCCAGTCCCAGGGGGCCGC poisson SOX9  
 668 CCCCCGGC- GAGCACT-----CGGGGCAATCCCAGGGGGCCAC humain SOX9  
 668 CCCCCGGG- GAGCACT-----CTGGGCAATCTCAGGGGTCCGC souris SOX9  
 671 CCCCCGGG- GAGCACT-----CAGGGCAGTCGCAGGGGGCCCC poulet SOX9  
 668 CTCCTGGA- GAACATT-----CAGGTCAATCCCAAGGCCCCC xenope SOX9

330 **CTACGCCACCCACCCACGCCCAAGACGGAGCTGCAAA-----A** axolotl SOX9  
 704 CGACACCACCCACGACCCCCAAAACAGACGTCCAGC-----C alligator SOX9  
 707 CCACTCCTCCCACCCACCCCGAAAACCTGACACACAGC-----C poisson SOX9  
 704 CGACCCACCCACCCACCCCAAAAACCGACGTGCAGC-----C humain SOX9  
 704 CGACCCACCCACCCACTCCCAAAAACCGACGTGCAAG-----C souris SOX9  
 707 CCACGCCCCCCCACCCACCCCAAAAACGGACGCTCAGCAGCC poulet SOX9  
 704 CAACTCCTCCA ACTACTCCCAAGACAGATATCCAGC-----C xenope SOX9

367 **CGGCAAG-----GACCCCAAACGCGATGGCCGCTACTKTTM** axolotl SOX9  
 741 TGGCAAAGCAAGACCTGAAGCGAGAAGGACGCCCCCTGCAA alligator SOX9  
 744 AGGCAAAGCGGATCTGA AACGAGAGGCCCGTCCTCTTCAG poisson SOX9  
 741 GGGCAAAGGCTGACCTGAAGCGAGAGGGGCGCCCCCTTGCCA humain SOX9  
 741 TGGCAAAGTTGATCTGAAGCGAGAGGGGCGCCCTCTGGCA souris SOX9  
 747 GGGCAAAGCAGGACCTGAAGCGCGAGGG-----CCCTTTGGCG poulet SOX9  
 741 TGGAAAGCCAGACCTAAAGAGGGGAGGGGCAGGCCACTGCAA xenope SOX9

404 **GASAGCAGCA-----AACCACCC-----ATTGACTTCGGCAACG** axolotl SOX9  
 781 GAGGGAGGGCGGCAGCCGCCCCACATTGACTTTCGAGACG alligator SOX9  
 784 GAAAACACCGGACGTCCGCTCAGCATCAACTTCCAGGACG poisson SOX9  
 781 GAGGGGGGCAGACAGCCCCCT-----ATCGACTTCCGCGACG humain SOX9  
 781 GAGGGGGGCAGACAGCCCCC-----ATCGACTTCCGCGACG souris SOX9  
 784 GAAGGCGGGCCGCCAACCTCCCCACATCGATTTCCGAGACG poulet SOX9  
 781 GAGAATGGTAGGCAGCCACCTCGCATTGATTTCCGAGATG xenope SOX9

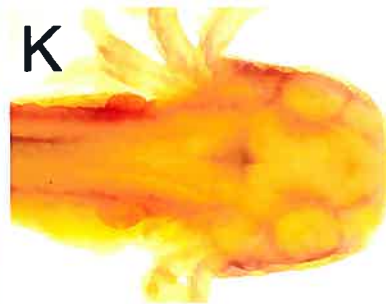
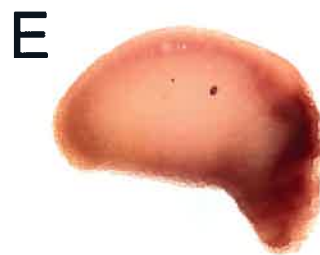
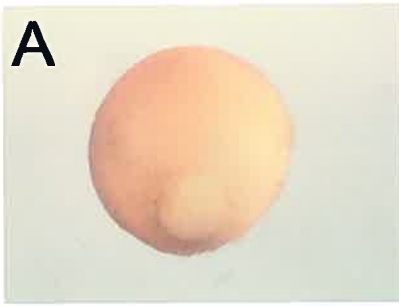
438 **TGGACATCGGTGAGCTCAGCA-----** axolotl SOX9  
 821 TGGACATCGGGGAGCTCAGCAGCGATGTCATCTCCAACAT alligator SOX9  
 824 TGGATATCGGCGAGCTGAGCAGCGATGTTATC----- poisson SOX9  
 818 TGGACATCGGCGAGCTGAGCAGCGACGTCATCTCCAACAT humain SOX9  
 818 TGGACATCGGTGAACTGAGCAGCGACGTCATCTCCAACAT souris SOX9  
 824 TGGACATCGGCGAGCTCAGCAGCGACGTCATCTCCAACAT poulet SOX9  
 821 TGGACATTGGTGAGCTGAGCAGTGAGGTGATCTCCACCAT xenope SOX9

### 3.1.2.1 Développement

Les études d'expression lors du développement ont été effectuées en utilisant la technique d'hybridation *in situ* sur les embryons entiers. Cette technique a déjà été employée avec succès pour des études d'expression pour le même gène sur les embryons de Xénope [146], de poulet [85], de souris [74, 86, 93, 95] et chez le poisson-zèbre [96] entre autres, pour leurs rôles lors de la chondrogénèse. La sonde d'ARN a été produite à partir du plasmide linéarisé et purifié. La polymérase utilisée pour *Sox-9* est l'ARN polymérase T3 qui produira une sonde antisens. Les résultats obtenus pour *Sox-9* sur les embryons d'axolotls pour cette technique sont présentés à la figure 4. (NOTE : Tous les stades du développement ont été identifiés à l'aide du livre : *Developmental Biology of the Axolotl* de J. B. Armstrong et G. M. Malacinski, publié en 1989 [42].

L'expression de *Sox-9* débute très tôt lors du développement embryonnaire chez l'axolotl, au stade 16-17, correspondant aux stades intermédiaires et tardifs de la neurulation. On peut observer le signal sur les bourrelets médullaires entourant la plaque neurale (figure 5 B). Un peu plus tard, aux stades plus tardifs de la neurulation (19), on voit apparaître les renflements des différentes parties du cerveau soit : partie antérieure, médiane et postérieure. À cette étape, le signal du gène se concentre surtout dans ces régions et le long des bourrelets médullaires qui fusionnent (figure 5 C). Au stade 22, l'embryon exhibe une très forte expression de *Sox-9* à l'extrémité antérieure, correspondant au futur cerveau, ce signal semble migrer le long du tube neural (figure 5 D). Il apparaît donc évident que *Sox-9* est exprimé surtout au niveau des tissus neuronaux, tels le futur cerveau et le tube neural. Au stade 26, l'expression de *Sox-9* se situe surtout au niveau de la partie postérieure de la tête de l'animal, formant ainsi un triangle dont les sommets s'étendent ventralement et postérieurement (figure 5 E). Cette région correspond à l'aire de migration des cellules de la crête neurale qui participent à la mise en place des différentes structures du corps de l'animal [147]. Plus tard, au stade 33-34, on remarque que le signal s'est concentré dans certaines régions de la partie antérieure de l'animal, comme les vésicules otiques, de même que le long de la moelle épinière (figures 5

**Figure 5 :** Expression de *Sox-9* au cours de différents stades de développement de l'axolotl. A) Stade 11½ où l'on peut apercevoir le blastopore. B) Stade 16-17 C) Stade 19 D) Stade 22 (vue dorsale) E) Stade 26 (vue latérale) F) Stade 33-34 (vue latérale) G) Stade 33-34 (vue dorsale) H) Stade 39 (vue latérale) I) Stade 39 (vue latérale) J) Stade 43 (vue latérale) K) Stade 43 (vue dorsale) L) Stade 46





F-G). On retrouve à peu près le même patron d'expression au stade 37, mais en plus, le signal se concentre autour des cavités orbitaires et au niveau de la mandibule en formation (figures 5 H-I). Au cours des derniers stades de développement embryonnaire de l'axolotl (42 à 44), on remarque une expression persistante le long de la colonne vertébrale, une expression plus intense au niveau des mâchoires, ainsi qu'une expression se limitant aux arêtes des os composant le crâne (figures 5 J-L). L'expression de *Sox-9* est donc surtout concentrée dans les régions où il y a mise en place des structures squelettiques de l'animal.

La classification utilisée jusqu'ici (Armstrong, 1989) [42] ne permet pas de caractériser les stades de développement de la patte puisque l'étape 44 est la dernière décrite par Armstrong. À ce moment (stade 44), les bourgeons des pattes avant commencent tout juste à apparaître sur les flancs de l'animal.

Afin de caractériser les étapes subséquentes du développement de l'axolotl qui se résument presque exclusivement à la croissance des pattes, nous avons eu recours à un article paru dans *Developmental Dynamics* par Nye *et al.* en 2003 [44]. Cet article décrit et montre très bien les différents stades du développement des pattes de l'axolotl. Au stade 44, il semble n'y avoir aucune expression visible de *Sox-9* dans le bourgeon des pattes avant (figure 6 A). Environ 3-4 jours plus tard, les membres avant de l'animal en sont au stade 46, où l'on dénote une forte expression de *Sox-9* dans tout le bourgeon (figure 6 B). Au stade 47, la patte commence à prendre sa forme et à s'aplatir dans sa partie plus distale. À ce moment, grâce à l'expression de *Sox-9* très intense au bout de la patte, on peut voir sous l'épiderme que *Sox-9* est très exprimé lors de la formation des doigts (figure 6 C). L'expression du gène *Sox-9* est donc, tel que vu dans la section précédente, confinée aux régions où il y a mise en place des éléments squelettiques par le processus de la chondrogénèse. Au stade 49, il semble que l'expression de *Sox-9* soit surtout concentrée sur le bout des futurs doigts ainsi que, quoique plus diffuse, sur le squelette de la patte en formation (figure 6 D). Dans l'étape précédant la fin du développement de la patte avant de l'axolotl, soit au stade 52, on remarque que le signal de *Sox-9* est limité au bout des doigts seulement (figure 6 E). Cette expression très spécifique et localisée est sans doute due au fait que, dans le reste de la patte, la mise en place du cartilage est terminée alors que le bout des doigts est encore en formation. L'étude de l'expression spatiale de *Sox-9* durant le développement embryonnaire de l'axolotl a permis d'établir une bonne corrélation entre une augmentation de l'expression de ce gène et la formation du squelette via la chondrogénèse. Le processus de régénération du membre chez l'axolotl implique la

**Figure 6 :** Expression de *Sox-9* durant le développement de la patte avant de l'axolotl A) Stade 44 B) Stade 46 C) Stade 47 D) Stade 49 E) Stade 52 Note : Les larves d'axolotls sont photographiées partie antérieure à gauche et partie postérieure à droite.





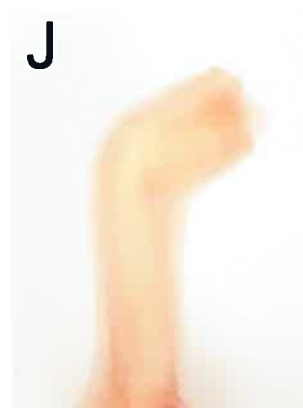
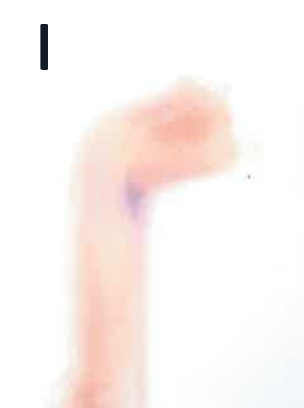
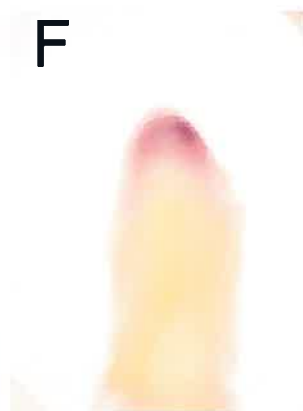
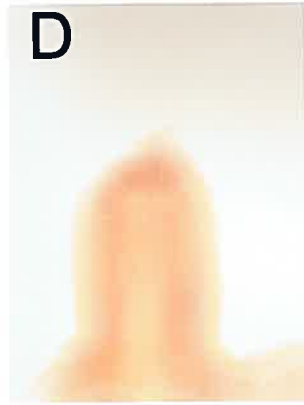
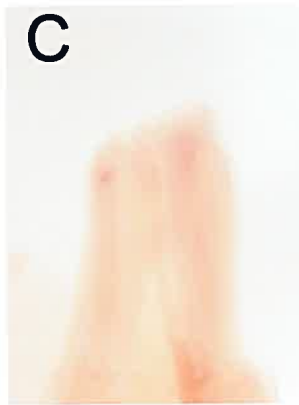
reformation complète et parfaite de la patte, la chondrogénèse est donc un processus essentiel à ce phénomène. Nous avons donc vérifié si *Sox-9* était encore associé à la formation de cartilage durant le processus de reformation du membre après amputation.

### 3.1.2.2 Régénération

Les études d'expression de *Sox-9* lors de la régénération ont été effectuées à différents stades du processus. Les animaux ont été amputés proximale et distalement et, par la suite, fixés aux différents temps retenus pour l'étude. Ces stades ont été déterminés comme suit : 0 correspondant à l'amputation, 6h correspond à la fixation de l'animal six heures après l'amputation et ainsi de suite pour 24h et 48h. Pour les stades plus avancés, l'article de Tank *et al.* (1976) est la référence pour distinguer les différentes étapes de la régénération, tels : bourgeon primaire (EB), bourgeon intermédiaire (MB), bourgeon tardif (LB), palette (PAL) et enfin différenciation des doigts (ED) [148]. En tout, huit stades sont étudiés pour caractériser l'expression de *Sox-9* lors de la régénération.

La figure 7 présente les résultats obtenus, pour l'expression de *Sox-9* durant la régénération, en utilisant la technique décrite plus haut d'hybridation *in situ* sur des membres entiers. Les stades 6h, 24h et 48h, ne présentent pas de signe apparent de l'expression de *Sox-9* au site d'amputation ou ailleurs dans le membre (figure 7 A-C, I-K). L'expression semble plutôt commencer au stade du bourgeon primaire, elle est très faible au niveau de l'amputation proximale (figure 7 D), mais semble un peu plus forte sur l'amputation distale (figure 7 L). L'expression de *Sox-9* semble donc commencer à ce moment précis de la régénération, le bourgeon primaire est le premier stade visible à l'œil nu du processus. Au stade du bourgeon intermédiaire, on voit s'intensifier de beaucoup le signal du gène *Sox-9*, autant au niveau proximal que distal, l'expression semble présente au niveau de tout le blastème (figures 7 E, M). Cette expression uniforme au blastème est aussi caractéristique du bourgeon tardif, qui se distingue notamment par un allongement du blastème de régénération (figures 7 F, N). C'est au niveau du stade palette que l'on peut observer quelques changements dans le patron d'expression de *Sox-9*. En effet, le signal semble un peu plus concentré dans les régions plus distales de la patte en régénération. L'expression se maintient malgré cela dans tout le reste du blastème (figures 7 G, O). Le dernier stade étudié pour la régénération des membres est la différenciation des doigts, ce

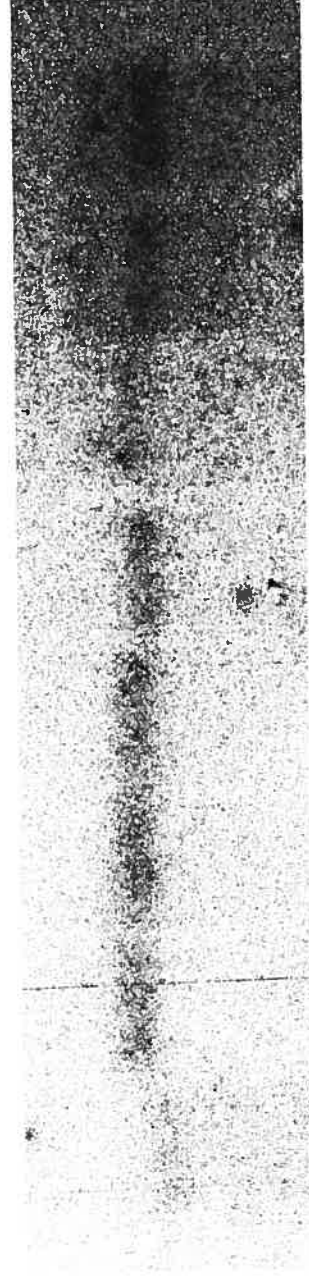
**Figure 7 :** Expression de *Sox-9* durant les différents stades de la régénération de la patte avant de l'axolotl. Expression du gène sur une amputation proximale (A-H) et distale (I-P). A) et I) Six heures après l'amputation B) et J) 24 heures après l'amputation C) et K) 48 heures après l'amputation D) et L) Stade du bourgeon primaire E) et M) Stade du bourgeon intermédiaire F) et N) Stade du bourgeon tardif G) et O) Stade de palette H) et P) Stade de la différenciation des doigts



**Figure 8 :** Analyse Northern de l'expression de *Sox-9* durant les différents stades de la régénération des pattes avant de l'axolotl. En haut, signal produit par l'hybridation de la sonde de *Sox-9*. En bas, chargement des ARNm (18S) sur le gel dénaturant détecté avec le bromure d'éthidium. 5µg d'ARNm ont été chargé sur le gel dénaturant.

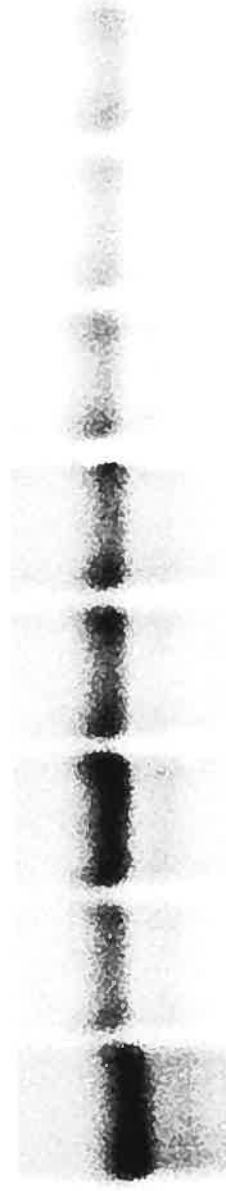
Hybridation avec  
la sonde d'ADN  
de *Sox-9*

0      6 h      24 h      48 h      EB      LB      PAL      ED



env. 4,4 Kb

Chargement des  
ARN messagers



stade se caractérise par une expression forte de *Sox-9* sur le contour des doigts exclusivement et plus fortement dans les interstices basaux de ceux-ci. Le reste de la patte ne démontre que très peu de signaux visibles. L'expression de *Sox-9* lors de la régénération semble, encore une fois, correspondre avec les zones d'activités intenses de formation de cartilage. La technique utilisée ici pour caractériser l'expression de *Sox-9* nous permet de donner au patron d'expression de *Sox-9* une troisième dimension, mais aussi indirectement, une indication du patron d'expression temporel du gène à l'étude. Pour vérifier ce nouvel élément, la technique d'analyse Northern Blot a été utilisée.

Une membrane a été préparée avec 5µg d'ARNm extraite aux différents stades de la régénération. Celle-ci est ensuite hybridée avec une sonde d'ADN marquée au phosphore 32. Les résultats obtenus sont présentés à la figure 8, où l'on observe une bande à une hauteur d'environ 4,4 Kb, correspondant à la longueur de l'ARN messager de *Sox-9* [74, 80]. On observe une expression faible, mais soutenue de *Sox-9* dans les premiers stades de la régénération et une augmentation du signal pour les stades de bourgeon tardif, palette et différenciation des doigts. Ces résultats ne permettent pas d'en venir aux mêmes conclusions que celles obtenues avec la technique de l'hybridation in situ. Une explication possible de ce phénomène est que pour la préparation de la membrane de Northern, il a été nécessaire de prélever pas moins de 40 blastèmes de pattes à chacun des stades pour obtenir assez de matériel, contrairement à la technique d'hybridation qui ne présente le signal que pour un seul blastème en régénération. Si le signal du gène est trop faible, la technique de l'hybridation in situ ne permettra pas de le visualiser.

## 3.2 PTHrP

### 3.2.1 Clonage

Le clonage de ce gène a été effectué avec la même technique que pour le gène précédant, soit le RT-PCR à partir d'ARN totale de larves d'axolotls. Les amorces utilisées pour la réaction de PCR ont été DFPTHRP (Degenerate Forward *PTHrP*) et DRPTHRP (Degenerate Reverse *PTHrP*) (figure 3 B). La longueur du segment attendu est de 237 pb selon l'emplacement des amorces sur l'alignement de séquences des autres espèces. Sur le gel d'électrophorèse, nous avons obtenu un doublet de bandes entre 300 et 500 pb (résultats non montrés). Après séquençage et analyse BLAST, la séquence clonée est de

**Figure 9 :** Alignements de la séquence clonée de *PTHrP* de l'axolotl (**en jaune**) avec la séquence du Fugu *sp.* (poisson), du rat, de la souris. L'alignement a été effectué grâce à l'algorithme Clustal W. Le domaine PTH commun à tous les gènes de cette famille est indiqué en orange.



1 -----CAAGGGAAGGTCGATTCAAGGAGCTC axolotl PTHrP  
1201 CCAGCTGATGCACGACAAGGGCCGCTCCCTGCAGGAGTTCC Fugu sp. PTHrP  
197 CCAGCTACTGCATGACAAGGGCAAGTCCATCCAAGACTTG rat PTHrP  
163 TCAGCTACTGCATGACAAGGGCAAGTCCATCCAAGACTTG souris PTHrP

26 CGAAGAAGAATATTCCTCCAGAACCTGATCGAGGGGGTGA axolotl PTHrP  
1241 AGGCGTCGCATGTGGCTCCACAAGCTGCTGGAAGAGGTCC Fugu sp. PTHrP  
237 --CGCCGCCGTTTCTTCCTCCACCATCTGATTGCGGAGATCC rat PTHrP  
203 --CGCCGCCGTTTCTTCCTCCACCATCTGATTGCGGAGATCC souris PTHrP

66 ACACGGCTGAACGTTTCAGTG-----CCGG-----AAGTGTCAC axolotl PTHrP  
1281 ACACGGCCAAACGAAGAAGCCCCACCTGTGCAGAGCAGGAC Fugu sp. PTHrP  
277 ACACAGCTGAAATCAGAGCTACCTCGG-----AGGTGTCCC rat PTHrP  
243 ACACAGCCGAAATCAGAGCTACCTCGG-----AGGTGTCCC souris PTHrP

99 CAGACCCCAAGCCCTC-----CACCAACACCAAGAA axolotl PTHrP  
1321 CCAGACCCCAACCTTCAGCGGGAACCTCCCTGCACGAGAAG Fugu sp. PTHrP  
313 CTAACCTCCAAACCTGC-----TCCCAACACCAAAAAA rat PTHrP  
279 CCAACTCCAAACCTGC-----TCCCAACACCAAAAAA souris PTHrP

130 CTACAACAA-----CAATGTCCGCTACGGCC axolotl PTHrP  
1361 CCCCCGGGGGCCACCAAGAACCTCCCTGACAGGTTTCAGTT Fugu sp. PTHrP  
344 CCACCC-----TGTGCGGTTTGGGT rat PTHrP  
310 CCACCC-----CGTGCGGTTTGGGT souris PTHrP

156 CTGAGGACGAGGGGTAAATACCTACCTCAGGAAA CCAACAA axolotl PTHrP  
1401 TGGACCGAGAGGGGCACGAACCTGCCCCAGGAGACGAACAA Fugu sp. PTHrP  
364 CAGACGACGAGGGGCAGATACCTAACTCAGGAAACCAACAA rat PTHrP  
330 CAGACGATGAGGGGCAGATACCTAACTCAGGAAACCAACAA souris PTHrP

196 GGCGGCG- CCTACAAAGAGCCCGCCCTGAA----GACGACG axolotl PTHrP  
1441 GGCTTTGGCTTACAAAGACCAGCCGCTTAAACTGGCCACC Fugu sp. PTHrP  
404 GGTGGAGACGTACAAAGAGCAGCCACTCAA----GACGCC rat PTHrP  
370 GGTGGAGACGTACAAAGAACAGCCACTCAA----GACACC souris PTHrP

232 GGGAAGAAGAAAAAGGTGAAGCCGNGGAAGCCCGTGCCAG axolotl PTHrP  
1481 AAGAGGAAAAAGAAAGGCGAGGTTAGGTGCGGCAC-----Fugu sp. PTHrP  
441 GGGAAGAAGAAGAAAGGCAAGCCGGGGAAACGC----- rat PTHrP  
407 GGGAAGAAGAAGAAAGGCAAGCCTGGGAAACGC----- souris PTHrP

272 GCGTCAGCGCNCNGGCTGAAAAAGAGCTGTG-----TCGGAG axolotl PTHrP  
1514 -----AGAGAGGCTGACAAGAAGCGGAGGCGGG---CGCGCT Fugu sp. PTHrP  
474 -----AGAGAACAGGAGAAAAAAGCGAAGGACTCGGTC rat PTHrP  
440 -----AGAGAACAGGAGAAAAAGAAGCGAAGGACTCGGTC souris PTHrP

309 CATCAGCTGATGCACGACAAGGGAAGGTCGATT----- axolotl PTHrP  
1548 CGGTAGCAAAGGAGCCTTGAAGGATGCGCTGTTGCCCTGG Fugu sp. PTHrP  
509 TGCCTGGCCAGGCACAACCTGGGAGTGGCCTGCTT----- rat PTHrP  
475 TGCCTGGCCAAGCACAGCTTCGAGTGGCCTGCTT----- souris PTHrP

343 -----AGGAGCTCCGAAGAAGAATATTCCTCCAGAACCTGAT axolotl PTHrP  
1588 CAAAGAGACTCTCAGTAA-----CCTTCCTATGGTACTGCAC Fugu sp. PTHrP  
543 -----GAGGACCCCCAGCCC-----CACACCTCCCCGACCTCGA rat PTHrP  
509 -----GATTACCCCCTGCCC-----CACACCTCCAGGACCTCG- souris PTHrP

38 **CGAGGGGGTGAACACGGCTGAAC---G TTCAGTGCCGGAAG** axolotl PTHrP  
 1625 TAAGACACTGACACAGGCCAGCCAGACTGGGATCTGAGA Fugu sp. PTHrP  
 577 CCTCCCTG---GAGCCCAGCTCAAG---GAC---GCATTGAAAC rat PTHrP  
 542 -----CTG---GAGCCCAGCTTAAG---GAC---GCATTGAAAT souris PTHrP  
  
 418 **TGTCACCAGACCCCA-------AGCCCTCCACCAACACCAAGAACT** axolotl PTHrP  
 1665 CTCTGCCCCGACTTCATATTACGATGCCAAAATCCTTTTGT Fugu sp. PTHrP  
 612 TTTCACCGAAGATCT-----TCCAAGGACACGTTACAGGATTCT rat PTHrP  
 572 TTTCATCGAAGATCT-----TCCAAGGACACGTTACAGG souris PTHrP  
  
 457 **ACAACAACAATGTCCGCTACGGCC-----CTGAGGACGAG-----** axolotl PTHrP  
 1705 ATGATAAAATGTTGCTATGCGTCTATTTTTTATACTTCCT Fugu sp. PTHrP  
 651 GTAATAGTAAACATATGGAAAGTA TTAGACATATTTATT rat PTHrP  
 605 ----- souris PTHrP

avec une valeur E de 0,004, ce qui est très élevé par rapport au gène *Sox-9*. Cette valeur E élevée signifie que la séquence soumise possède très peu d'homologies avec les autres séquences composant la banque de données (table 1). Avec ce faible indice d'homologie, nous avons tenté de faire une analyse BLAST sur les protéines en traduisant la séquence obtenue, le résultat pour cet essai est l'obtention d'une valeur E de  $2e-20$ , ce qui nous apporte une preuve de plus que la séquence clonée est bien *PTHrP* de l'axolotl. La séquence clonée est dans le même sens (5'-3') que le plasmide dans lequel elle a été clonée et par rapport à l'amorce utilisée au séquençage. La séquence est beaucoup plus longue que prévue si l'on se fie aux amorces, mais cela s'explique par la formation de trouées dans la séquence due au faible degré d'homologie entre les différentes espèces (environ 60%) (figure 9).

### 3.2.2 Études d'expression

Les études d'expression effectuées pour *PTHrP* utilisent toutes des sondes qui ont été synthétisées à partir du plasmide séquencé.

#### 3.2.2.1 Développement

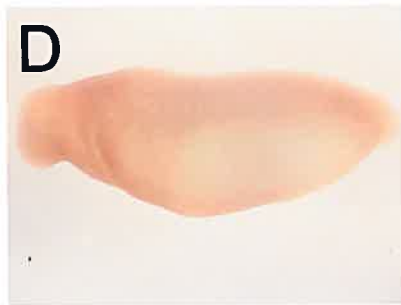
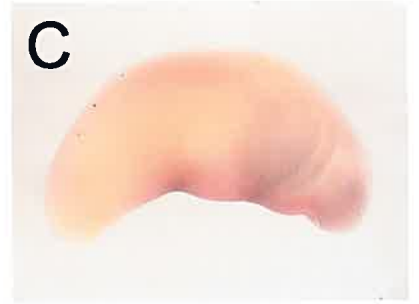
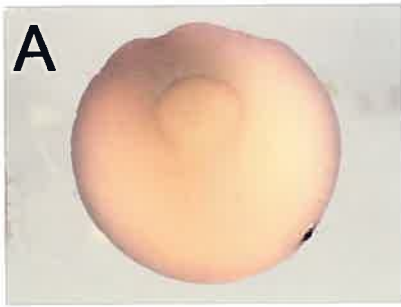
La technique d'hybridation in situ sur les membres entiers a été utilisée pour les études d'expression autant lors du développement que lors de la régénération. Pour ce qui est de *PTHrP*, plusieurs études ont déjà utilisé la technique d'hybridation in situ mais elles étaient effectuées majoritairement sur des sections de tissus [114, 116, 117], mais très peu l'ont été sur des membres entiers [118]. La sonde d'ARN antisens a été produite à partir du plasmide linéarisé et purifié et ensuite synthétisée à l'aide de l'ARN polymérase T3.

La caractérisation des stades du développement s'est effectuée à l'aide du livre d'Armstrong [42]. Lors des stades précoces du développement, c'est-à-dire lors de la gastrulation (figure 10 A), la neurulation (figure 10 B) et même sur des stades plus avancés, tels que présentés dans les figures 10 C, D et E, on ne constate aucune expression de *PTHrP*. C'est au stade 43, que l'on peut apercevoir une faible expression au niveau du crâne de l'animal, au niveau du *tectum synoticum*\* et de la jonction entre l'os pariétal et les condyles occipitaux (figure 10 F). L'expression la plus forte à ce stade se situe au niveau de la

colonne

\* voir Lexique

**Figure 10 :** Expression de *PTHrP* lors de différents stades du développement de l'axolotl. A) Stade 11½ B) Stade 16 C) Stade 28 D) Stade 32 (vue latérale) E) Stade 32 (vue dorsale) F) Stade 43 (vue antérieure dorsale) G) Stade 43 (vue latérale) H) Stade 44 I) Stade 49 (vue ventrale).



**Figure 11 :** Expression de *PTHrP* lors de différents stades de développement de la patte avant de l'axolotl A) Stade 46 B) Stade 47 C) Stade 49 D) Stade 51 E) Stade 52 Note : Les larves d'axolotls sont photographiées partie antérieure à gauche et partie postérieure à droite.



vertébrale de l'animal (figures 10 G-H) Un peu plus tard, on peut remarquer, sur une vue ventrale de l'animal, l'expression de *PTHrP* qui entoure le système digestif de l'animal. On peut donc conclure que l'expression de *PTHrP* lors du développement est très réduite et est possiblement associée à la présence de structures cartilagineuses plus matures.

Pour ce qui est des stades de développement de la patte, la référence pour l'identification reste celle de Nye *et al.* [44]. L'expression lors des différents stades de la patte de l'axolotl reste absente des étapes précédant le stade 51 (figures 11 A-C). On dénote ensuite une très faible expression de *PTHrP* à l'extrémité des doigts les plus développés, à partir du stade 51 (figure 11 D) et cette expression tend ensuite à diminuer avec la maturation et la croissance des doigts (stade 53) (figure 11 E). Nous pouvons donc conclure que l'expression de *PTHrP* se concentre surtout dans une zone de croissance intense et durant une période très courte.

### 3.2.2.2 Régénération

Encore cette fois, l'article de Tank *et al.*(1976) a été utilisé pour la détermination des différents stades de régénération des pattes de l'axolotl [148]. Les résultats obtenus pour cette partie du travail sont présentés à la figure 12. Tout comme *Sox-9*, l'expression de *PTHrP* ne débute qu'à l'étape du bourgeon primaire, les stades précédents ne démontrent aucun signal autant sur les amputations proximales que distales (figures 12 A-C, I-K). Par contre, au bourgeon primaire, l'expression débute très fortement dans le blastème en formation (figures 12 D, L). Il est surprenant de constater que la patte ayant été amputée distalement ne présente pas un signal aussi fort que celle amputée proximale. C'est cependant au niveau du bourgeon intermédiaire que l'expression de *PTHrP* est la plus forte et elle est répartie dans tout le blastème et ce, autant au niveau proximal que distal (figures 12 E, M). Pour ce qui est du bourgeon tardif et du stade palette proximal (figures 12 F-G), l'expression reste constante et bien répartie dans tout le blastème. Les amputations distales pour ces deux stades démontrent un autre patron d'expression. En effet, il semble que l'expression soit concentrée au niveau du poignet et à la naissance des futurs doigts (figures 12 N-O). Le stade de la différenciation des doigts est caractérisé par une expression de *PTHrP* autour des futurs doigts et dans la région postérieure de la patte (figures 12 H, P). On peut donc conclure que l'expression de *PTHrP* est concentrée dans les régions



**Figure 12 :** Expression de *PTHrP* durant les différents stades de la régénération de la patte avant de l'axolotl. Expression du gène sur une amputation proximale (A-H) et distale (I-P). A) et I) Six heures après l'amputation B) et J) 24 heures après l'amputation C) et K) 48 heures après l'amputation D) et L) Stade du bourgeon primaire E) et M) Stade du bourgeon intermédiaire F) et N) Stade du bourgeon tardif G) et O) Stade de palette H) et P) Stade de la différenciation des doigts

A



B



C



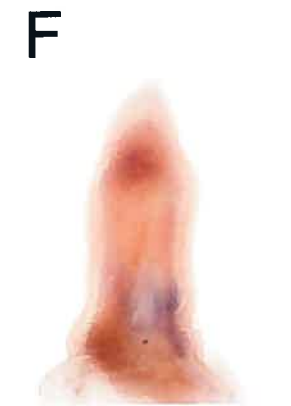
D



E



F



G



H



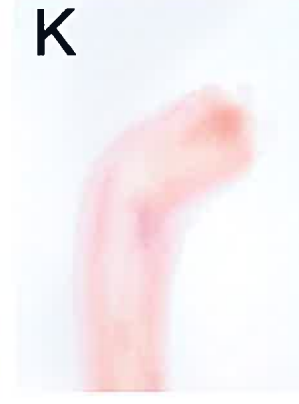
I



J



K



L



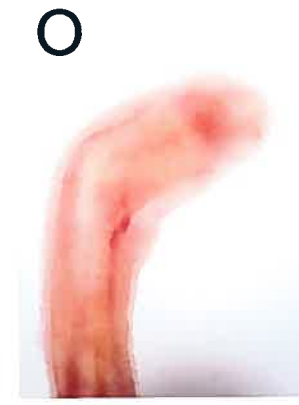
M



N



O



P



d'activités mitotiques intenses et les endroits où il y a développement de structures cartilagineuses, comme les doigts, par exemple.

### 3.3 Cbfa-1

#### 3.3.1 Clonage

Le clonage de *Cbfa-1* a été effectué avec la méthode du RT-PCR. Lors de la réaction de PCR, des amorces dégénérées ont été utilisées afin de permettre de plus grandes possibilités d'attachement au substrat, c'est-à-dire l'ARN totale de larves d'axolotls. La séquence des amorces utilisées est montrée à la figure 3 C et porte le nom de DFCBFA (Degenerate Foward *Cbfa-1*) et DRCBFA (Degenerate Reverse *Cbfa-1*). Le signal attendu, selon l'espacement des amorces, est de 564 pb. Après le PCR, l'observation du gel d'électrophorèse nous montre une bande d'environ 550 pb (résultats non montrés). Le séquençage et l'analyse de la séquence obtenue nous démontrent que nous avons bel et bien cloné *Cbfa-1* et que la séquence antisens (+/-), donc inversée selon le plasmide est, en fait, de 387 pb. La valeur E obtenue est très faible (6e-78) suggérant la très grande homologie entre la séquence clonée chez l'axolotl et celles des autres espèces. En fait, il y a environ 84 % d'homologie entre la séquence clonée et les autres espèces telles le rat, la souris, le poulet et l'humain (figure 13)(table 1). Nous avons ensuite voulu savoir où et quand ce gène était exprimé lors du développement et de la régénération de l'axolotl.

#### 3.3.2 Études d'expression

##### 3.3.2.1 Développement

Pour déterminer le patron d'expression de *Cbfa-1* lors du développement et de la régénération, nous avons utilisé la technique d'hybridation in situ sur des embryons et des membres entiers. Cette technique s'est avérée très bien fonctionner avec ce gène dans quelques études portant notamment sur les embryons de poisson-zèbre [149] et de souris [127, 134, 150], notamment pour l'implication de ce gène dans la mise en place des phases plus avancées de la squelettogénèse. Nous avons donc produit une sonde d'ARN antisens à

**Figure 13 :** Alignements de la séquence clonée de *Cbfa-1* de l'axolotl (**en jaune**) avec les séquences du poisson, du Fugu *sp.*, de l'humain, du poulet, de la souris et du singe. L'alignement a été effectué grâce à l'algorithme Clustal W. Le domaine Runt est indiqué en bleu.

1 -----GGACCGAGAACTTTTCAAGGCTGAGCTAGCA axolotl Cbfa-1  
1 -----ATGGCGTCTAACAGTCTTTTCAGCTCGGTGACTCCG poisson Cbfa-1  
1 -----ATGGCATCTAACAGCCTTTTCAGCACAGTGACACCA Fugu sp Cbfa-1  
1 ----- human cbfa-1  
1 -----ATGGCATCAAACAGCCTCTTCAGCTCCGTGACACCA poulet Cbfa-1  
201 GACTATGGCGTCAAACAGCCTCTTCAGCGCAGTGACACCG souris Cbfa-1  
153 AGCTATGGCATCCAACAGTCTTTTCAGCACAGTGGGACCA singe Cbfa-1

33 AAATAAGGGGGCATTTCCTTTATTTATTCTTTTGT----GTG axolotl Cbfa-1  
37 TGTCAGCAGAACTTTTTCTGGGATCCGAGCACCAGCCGCA poisson Cbfa-1  
37 TGTC AACAGAACTTCTTCTGGGATCCCAGCGCGACTCGGA Fugu sp Cbfa-1  
1 -----ATGCGTATTCCTGTAG-ATCCGAGCACCAGCCGGC humain cbfa-1  
37 TGTCAGCAAAACTTCTTTTGGGATCCCAGCACCAGCCGGA poulet Cbfa-1  
241 TGTCAGCAAAGCTTCTTTTGGGATCCGAGCACCAGCCGGC souris Cbfa-1  
193 TGTCAGCAGAACTTCTTCTGGGATCCCAGCGCCACTCGGA singe Cbfa-1

72 TATCCGGGGGAAAAAGACAAGAGACTTTATTTGTTTTCGCC axolotl Cbfa-1  
77 GGTTCAGTCCGCCGTCCAGCAGCCTTCAGCCGGTGG-------C poisson Cbfa-1  
77 GGTTCAGTCCGCCGTCCAGTAGCCTCCAGCCGGTCC-------C Fugu sp. Cbfa-1  
35 GCTTCAGCCCCCCTCCAGCAGCCTGCAGCCCGGCAAAAT humain cbfa-1  
77 GGTTCAGCCCCCCTCCAGCAGCCTGCAGCCCGGCAAGAT poulet Cbfa-1  
281 GCTTCAGCCCCCCTCCAGCAGCCTGCAGCCCGGCAAGAT souris Cbfa-1  
233 GGTTCAGTCCGCCGTCCAGCAGCCTCCAGCCGGTCT------C singe Cbfa-1

112 TGGAAAGGACTTTAGAGTG-----CAGTGACGGAG axolotl Cbfa-1  
114 GGGGAAGATGAGCGATGCG-----CAGCCGG-- poisson Cbfa-1  
114 AGGGAAAATGAACGATGTGA-----GCTCCCCGACCGGG-- Fugu sp. Cbfa-1  
75 GAGCGACGTGAGCCCGGTGGTGGCTGCGCAACAGCAGCA-- humain cbfa-1  
117 GAGCGAGGTCAGCCCGGTCTAGTGGCCCAACAGCAGCA-- poulet Cbfa-1  
321 GAGCGACGTGAGCCCGGTGGTGGCTGCGCAGCAGCAGCAA souris Cbfa-1  
270 TGGGAAGATGAACGATGTGA-----GCCCCCGGCGCGGG-- singe Cbfa-1

142 -----TCTTTGGCATTTCAGTAGTCT axolotl Cbfa-1  
140 ----- poisson Cbfa-1  
148 ----- Fugu spCbfa-1  
114 -----GCAACAGCAGCAGCAGCAACAGC humain cbfa-1  
156 ----- poulet Cbfa-1  
361 CAGCAGCAGCAGCAGCAGCAACAGCAGCAGCAACAACAGC souris Cbfa-1  
304 ----- singe Cbfa-1

164 TTTTTTGAGGGGAG-----CAGGAGCGCGGATCGTTTATTGG-- axolotl Cbfa-1  
140 -----AGC-----CGAACGC-----GGT----- poisson Cbfa-1  
148 -----CAGC-----CGGACGCGGCGGCGGC----- Fugu spCbfa-1  
137 AGCAGCAGCAGCAGCAACAGCAGCAGCAGCAGCAGGAGGC humain cbfa-1  
156 -----GCAGCAGCAACAGCAACAGCAGCAAGAA----- poulet Cbfa-1  
401 AACAGCAACAACAGCAGCAGCAGCAGCAGCAGCAGGAGGC souris Cbfa-1  
304 -----CAGC-----CGGACGCGGCGGCGGC----- singe Cbfa-1

203 AGC-----T----- axolotl Cbfa-1  
153 ----- poisson Cbfa-1  
168 ----- Fugu spCbfa-1  
177 GGCGGCGGCGGCTGCGGCGGCAGCGGCGGCTGCGGC-----G humain cbfa-1  
183 ----- poulet Cbfa-1  
441 GGCCGCAGCAGCAGCAGCGGCGGCAGCGGCGGCGGCAGCAGCGG souris Cbfa-1  
324 ----- singe Cbfa-1

207 -----CGAGTGACGTTCCCCGGCTGCAGACA---GTGTGTGC axolotl Cbfa-1  
 153 -----GGTGCCGAGACTCCGACCT-----CACGACA poisson Cbfa-1  
 168 -----GGTACCCAGGCTGCGTCCC-----CACGAAA Fugu sp. Cbfa-1  
 214 GCGGCAGCTGCAGTGCCCCGGTTGCGGCCGCCACGACA humain cbfa-1  
 183 -----AGCCGCCGTGCCCCGGCTGCGGCCG-----CAGGATA poulet Cbfa-1  
 481 GCGGCGGCCGCACTGCCCCGATTGAGGCCGCCGACGACA souris Cbfa-1  
 324 -----GGCGCCAAGGCTGCGCCCC-----CAGGAGA singe Cbfa-1

241 TCTCGTTTGTCTTGAGGGGGGAAACGGCTCGT-----GTTTT axolotl Cbfa-1  
 179 ACCGGACCATGGTGGAGATCATAGCGGACCACCCCGCCGA poisson Cbfa-1  
 194 ACCGCAGCATGGCAGAGATCATCGCGGACCACCCAGCCGA Fugu sp. Cbfa-1  
 254 ACCGCACCATGGTGGAGATCATCGCCGACCACCCGGCCGA humain cbfa-1  
 215 ACCGCACCATGGTGGAGATCATCGCCGACCACCCGGCCGA poulet Cbfa-1  
 521 ACCGCACCATGGTGGAGATCATCGCGGACCACCCGGCCGA souris Cbfa-1  
 350 ACCGCAGCATGGCCGAGATCATAGCCGACCACCCGGCCGA singe Cbfa-1

278 TTTGGTGCGCACCGACAGCCCCAACTTCCTGTGCTCCGTG axolotl Cbfa-1  
 219 GCTCGTGCGCACGGACAGCCCCAACTTTCTGTGCTCGGTG poisson Cbfa-1  
 234 GCTAGTCCGGACCGACAGCCCCAACTTTCTGTGCTCTGTC Fugu sp. Cbfa-1  
 294 ACTCGTCCGCACCGACAGCCCCAACTTCCTGTGCTCGGTG humain cbfa-1  
 255 GTTGGTCCGCACCGACAGCCCCAACTTCCTGTGCTCCGTG poulet Cbfa-1  
 561 ACTGGTCCGCACCGACAGTCCCAACTTCCTGTGCTCCGTG souris Cbfa-1  
 390 GTTGGTCCGGACCGACAGCCCCAACTTTCTTTGCTCGGTG singe Cbfa-1

318 CTGCCCAGCCACTGGCGCTGCAACAAGACGCTGCCCGTGG axolotl Cbfa-1  
 259 CTGCCGTCTCACTGGAGGTGCAACAAAACGCTCCCTGTGG poisson Cbfa-1  
 274 CTGCCCTCCCCTGGCGGTGCAACAAGACGCTACCTGTGTC Fugu sp. Cbfa-1  
 334 CTGCCCTCGCACTGGCGCTGCAACAAGACCCTGCCCGTGG humain cbfa-1  
 295 CTGCCCTCGCACTGGCGCTGCAATAAGACCCTCCCCTGTGG poulet Cbfa-1  
 601 CTGCCCTCGCACTGGCGGTGCAACAAGACCCTGCCCGTGG souris Cbfa-1  
 430 CTGCCCTCCCCTGGCGATGCAACAAGACGCTGCCTGTGTC singe Cbfa-1

358 CCTTCAAGGTGGTAGGTTTCGGCGAGGTGCCCGATGGAAAC axolotl Cbfa-1  
 299 CGTTTAAGGTGTGGCTCTGGGAGATGTTCTGACGGGAC poisson Cbfa-1  
 314 CGTTCAAGGTGGTCGCTCTGGGAGACATACCTGACGGCAC Fugu sp. Cbfa-1  
 374 CCTTCAAGGTGGTAGCCCTCGGAGAGGTACCAGATGGGAC humain cbfa-1  
 335 CCTTCAAGGTGGTGGCCTTAGGAGAAGTGCCCGATGGGAC poulet Cbfa-1  
 641 CCTTCAAGGTGTAGCCCTCGGAGAGGTACCAGATGGGAC souris Cbfa-1  
 470 CCTTCAAGGTGGTTGCCCTCGGGGATATACCTGACGGGAC singe Cbfa-1

398 TGTGGTCACTGTTCATGG----- axolotl Cbfa-1  
 339 GGTGGTGACGGTAATGGCTGGCAATGACGAAAACCTATTTCG poisson Cbfa-1  
 354 GGTGGTCACAGTCATGGCGGGCAACGACGAGAATTATTTCG Fugu sp. Cbfa-1  
 414 TGTGGTTACTGTTCATGGCGGGTAACGATGAAAATTATTCT humain cbfa-1  
 375 CGTGGTCAACCGTGATGGCTGGGAACGACGAGAACTACTCC poulet Cbfa-1  
 681 TGTGGTTACCGTCATGGCCGGGAATGATGAGAACTACTCC souris Cbfa-1  
 510 GGTGGTTACTGTGATGGCGGGCAACGACGAGAACTACTCC singe Cbfa-1

partir du plasmide séquencé, linéarisé et purifié, à l'aide de l'ARN polymérase T7. Encore cette fois-ci, les stades embryonnaires ont été identifiés à l'aide des textes de Armstrong et de Nye *et al.* [42, 44]. Les résultats que nous avons obtenus sur les embryons d'axolotls à différents stades sont présentés à la figure 14. Dans les toutes premières phases de développement de l'embryon, on ne remarque aucun signal du gène *Cbfa-1* (figures 14 A-D). En fait, il semble que *Cbfa-1* n'est exprimé qu'à partir du stade 43, où on le retrouve surtout sur le dessus du crâne au niveau du *tectum synoticum* et très faiblement dans la région de la colonne vertébrale (figure 14 E). Un peu plus tard, le signal va s'intensifier à ce niveau et il va s'étendre à plusieurs structures squelettiques du crâne, comme les os occipitaux, plusieurs sutures crâniennes et la mandibule (figures 14 F-I).

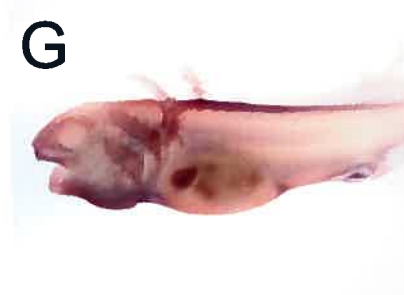
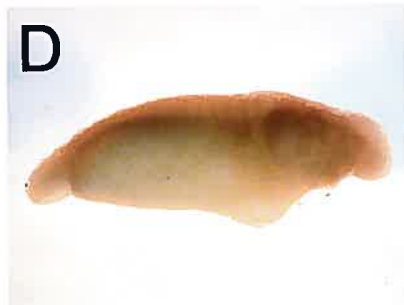
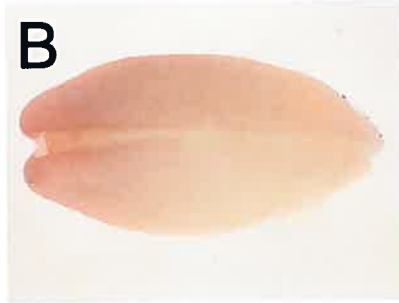
Ce n'est que lorsque débute le développement de la patte que l'on voit vraiment apparaître un signal positif. En effet, c'est au stade 46 et 47, selon la classification de Nye *et al.* [44], que l'on note un signal à la base de la patte en formation, un endroit qui pourrait correspondre au début de la mise en place des structures cartilagineuses (figures 15 A-B). À la figure 15 C, correspondant au stade 49, on peut voir très clairement deux points d'expression qui correspondent aux futurs doigts. Plus tard, au stade 51 environ, on remarque un patron d'expression unique (figure 15 D). En effet, en plus du signal des deux doigts en formation, on remarque trois points qui pourraient correspondre à la localisation des os du carpe. Un peu plus bas, un signal qui semble se trouver au niveau des os de la main et de l'avant bras. Les deux os de l'avant-bras sont eux-aussi très bien définis par un signal d'une bonne intensité (figure 15 D). Au stade 52, on peut remarquer que le signal se retrouve uniquement dans les diaphyses de os des doigts et que celui-ci est particulièrement fort au bout de l'un des doigts encore en formation (figure 15 E). On peut donc conclure que *Cbfa-1* est un gène exprimé dans les stades avancés du développement et qu'il semble être plus précisément exprimé dans les parties plus matures des os des pattes en croissance.

### 3.3.2.2 Régénération

Pour les études d'expression de *Cbfa-1* lors de la régénération du membre chez l'axolotl, nous avons, encore une fois, fait appel à la technique d'hybridation *in situ* sur les membres entiers à différentes étapes de la régénération du membre. Les différents

**Figure 14 :** Expression de *Cbfa-1* lors de différents stades du développement de l'axolotl.  
A) Stade 11½ B) Stade 17-18 C) Stade 22 D) Stade 36 E) Stade 41 F) Stade 47 G) Stade 49 H) Stade 52 (vue latérale) I) Stade 52 (vue dorsale de la partie antérieure)





**Figure 15 :** Expression de *Cbfa-1* lors du développement de la patte avant de l'axolotl. A) Stade 44 B) Stade 47 C) Stade 50 D) Stade 51 E) Stade 52 Note : Les larves d'axolotls sont photographiées partie antérieure à gauche et partie postérieure à droite.

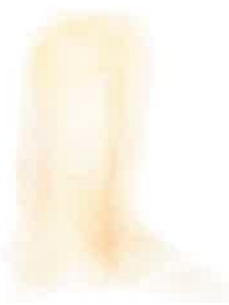


**Figure 16 :** Expression de *Cbfa-1* durant les différents stades de la régénération de la patte avant de l'axolotl. Expression du gène sur une amputation proximale (A-H) et distale (I-P). A) et I) Six heures après l'amputation B) et J) 24 heures après l'amputation C) et K) 48 heures après l'amputation D) et L) Stade du bourgeon primaire E) et M) Stade du bourgeon intermédiaire F) et N) Stade du bourgeon tardif G) et O) Stade de palette H) et P) Stade de la différenciation des doigts

A



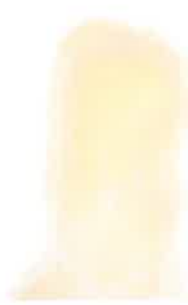
B



C



D



E



F



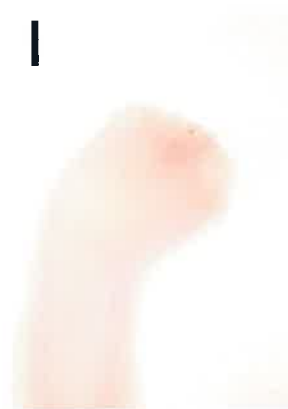
G



H



I



J



K



L



M



N



O



P



stades ont été identifiés grâce au texte de Tank sur la caractérisation de la régénération chez l'axolotl [148]. Les résultats de l'étude de l'expression de *Cbfa-1* sont présentés à la figure 16. On peut observer qu'il n'y a aucun signal visible de *Cbfa-1* dans les premiers stades de la régénération, c'est-à-dire aux stades: 6h, 24h, 48h, bourgeon primaire et bourgeon intermédiaire, et ce, autant sur l'amputation distale que proximale (figures 16 A-E, I-M). L'expression qui semble s'établir à partir du stade du bourgeon tardif est très faible et se situe au bout du blastème (figures 16 F, N). L'expression s'intensifie quelque peu au stade palette et semble se concentrer dans les zones où se développeront les futurs doigts (figures 16 G, O). C'est au stade de la différenciation des doigts que l'expression de *Cbfa-1* semble être la plus forte. On dénote un fort signal sur le doigt en développement sur l'amputation distale (figure 16 P) et une expression suivant le contour des doigts autant distalement que proximement (figures 16 H, P). Ce que l'on peut conclure de ces résultats, c'est que *Cbfa-1* ne semble pas impliqué dans les étapes précoces de la régénération. En fait, il semble plutôt impliqué dans le phénomène de mise en place des doigts au cours des toutes dernières étapes de la régénération de la patte.

La principale conclusion que nous pouvons tirer de chacune des études d'expression effectuées est que les trois gènes d'intérêts : *Sox-9*, *PTHrP* et *Cbfa-1* sont impliqués, à des niveaux différents de la mise en place des structures squelettiques. De plus, il semble que les trois gènes soient exprimés autant lors du développement embryonnaire que lors du processus de la régénération, mais à des niveaux d'expression très différents. Suite à ces résultats, nous nous sommes demandé justement comment se déroule le processus de mise en place des structures squelettiques d'un point de vue plus anatomique que moléculaire cette fois-ci.

### 3.4 Mise en place du squelette

#### 3.4.1 Développement des membres

Les larves d'axolotl ont été fixées à différents stades du développement de la patte antérieure selon l'article de Nye *et al.*[44]. Une technique de double coloration, colorant le cartilage en bleu et le tissu calcifié en rouge, a ensuite été appliquée sur les animaux. Les résultats obtenus sont présentés aux figures 17 et 18. À la figure 18, on observe une larve d'axolotl au stade 44; les arcs viscéraux, l'ensemble du cartilage du crâne et certaines des

**Figure 17 (en haut):** Double coloration (rouge alizarin et bleu d'alcian) sur les différents stades de développement de la patte avant de l'axolotl. A) Stade 46 B) Stade 47 C) Stade 48 D) Stade 49 E) Stade 50-51 F) Stade 52 G) Stade 53

**Figure 18 (en bas):** Double coloration sur une larve d'axolotl au stade 44



Figure 18





vertèbres de l'animal sont présentes. Le développement de la patte devient apparent au stade 46 où il est possible de distinguer un bourgeon proéminent. À cette étape, seulement les éléments de la ceinture pectorale de l'animal sont formés (figure 17 A). Au stade 47, il est possible de distinguer l'humérus complètement formé et au bout de celui-ci une ébauche du radius (figure 17 B). C'est à partir du stade 48 que le radius apparaît et s'allonge, l'ulna à ce moment-là est sous forme de bourgeon et n'est pas assez mature pour pouvoir le distinguer avec ce type de coloration (figure 17 C). C'est au stade 49 que l'on voit apparaître l'ulna, le radius lui, est de plus en plus long (figure 17 D). Les stades 50-51 se caractérisent par l'apparition et la mise en place des structures carpiennes (poignet et main) et métacarpiennes (doigts) des deux premiers doigts (figure 17 E). Au stade 52, les deux premiers doigts sont complets avec leurs phalanges et deux autres doigts commencent à apparaître. Les carpes sont tous visibles et l'ulna est complètement formé (figure 17 F). C'est au stade 53 que se complète le processus de développement de la patte avant de l'axolotl. À cette étape, on remarque que le troisième doigt est complet et que le quatrième doigt apparaît à angle droit. Les os du carpe sont complètement formés et la patte est tout à fait fonctionnelle (figure 17 G). Le stade 54 détermine la fin du développement des pattes avant de l'axolotl et le début du développement des pattes arrière (stade non montré). Nous pouvons donc conclure que le processus de développement de la patte se base sur un principe de formation des structures manquantes de l'épaule jusqu'aux bouts des doigts dans l'ordre. Nous nous sommes demandé si le processus de la régénération, reconnu pour former les parties distales en premier et ensuite former les structures manquantes avait certaines ressemblances avec celui du développement, comme les étapes de maturation du cartilage ou la mise en place de la matrice osseuse [151].

### 3.4.2 Régénération de la patte

En effet, de par son caractère intercalaire, la régénération tend à former les structures les plus distales pour ensuite compléter les structures intermédiaires [151]. La figure 19 présente l'évolution des tissus cartilagineux et calcifiés mise en évidence grâce à la technique de double coloration décrite plus tôt. Toutes les amputations ont été effectuées sur la partie proximale de la patte, c'est-à-dire au milieu de l'humérus. Sur la figure 19 A, on observe une patte 11 jours après l'amputation, approximativement au stade du bourgeon intermédiaire de la régénération. L'humérus apparaît ici en rouge car le site d'amputation

**Figure 19 (en haut):** Double coloration sur des pattes à différents stades de la régénération de la patte avant de l'axolotl. A) 11 jours après l'amputation B) 15 jours C) 25 jours D) 30 jours E) 35 jours F) 40 jours G) 45 jours H) 50 jours I) 55 jours J) 60 jours K) 65 jours L) 95 jours.

**Figure 20 (en bas) :** Double coloration effectuée sur une patte d'un axolotl mature.

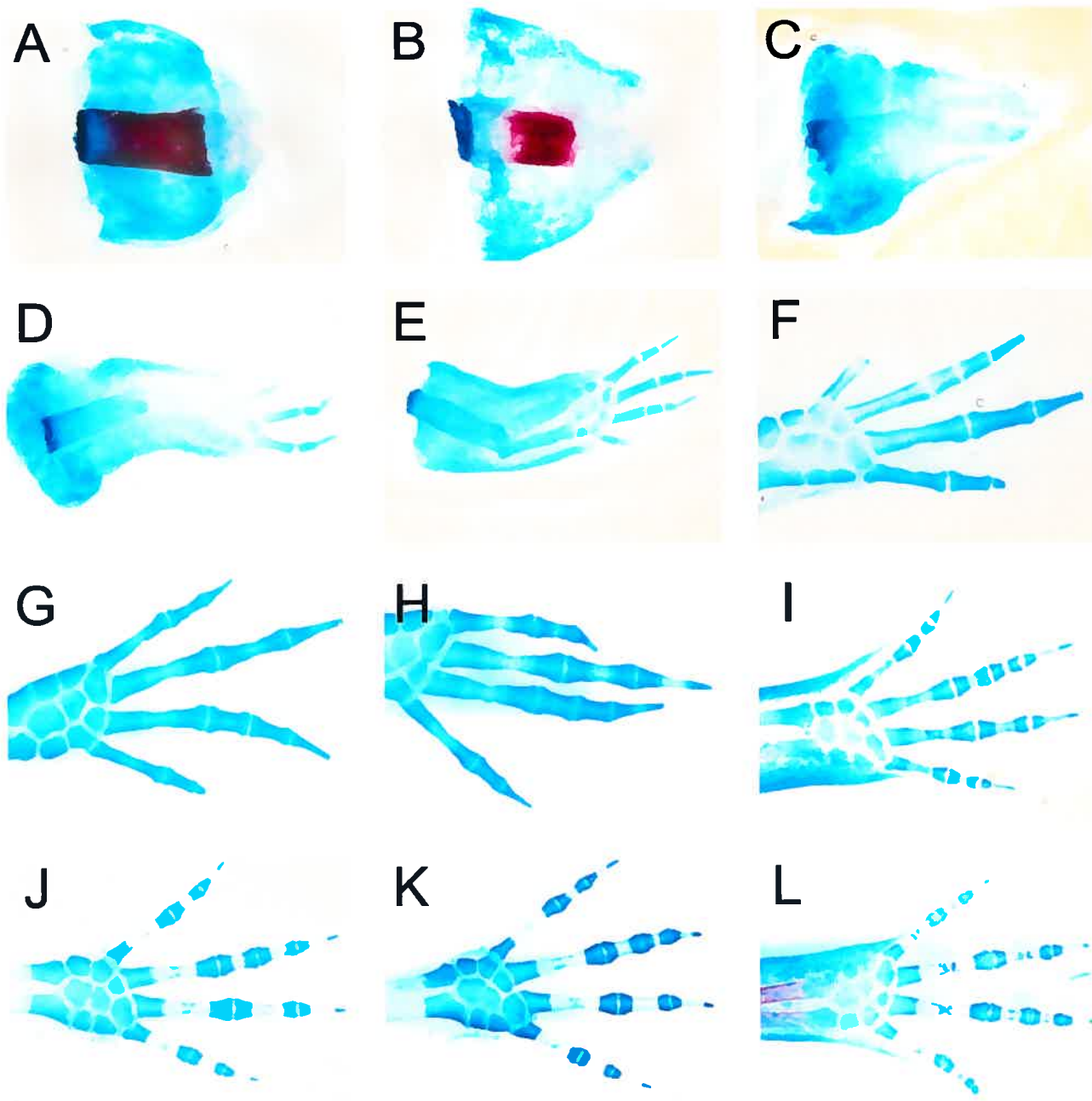
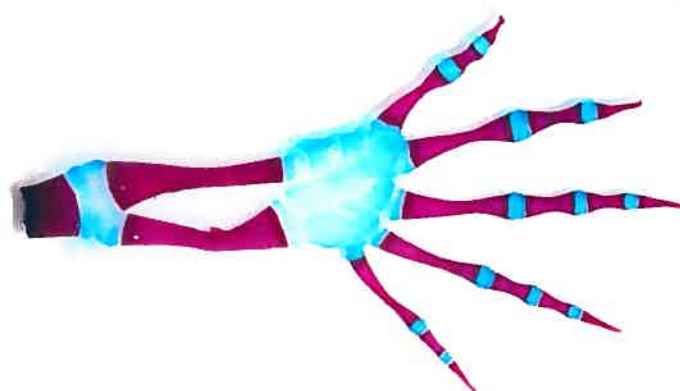


Figure 20



initial se trouve juste au-dessus de la jonction de celui-ci et du blastème. Après 15 jours de régénération, au stade palette, il n'y a toujours pas de structure cartilagineuse dans le blastème (figure 19 B). Ce n'est que 20-25 jours après l'amputation que l'on voit apparaître l'ébauche cartilagineuse du radius et de l'ulna et les quelques métacarpes nous apparaissent très clairement (figure 19 C). Cinq jours plus tard, les deux premiers doigts sont complètement formés et le troisième doigt possède déjà deux métacarpes. Le radius et l'ulna demeurent courts et très pâles (figure 19 D). Au 35<sup>ième</sup> jour, le troisième doigt est complet et le quatrième possède deux métacarpes, l'ulna et le radius semblent se distinguer de plus en plus (figure 19 E). C'est au 40<sup>ième</sup> jour que la patte a repris sa forme complète et que la croissance et la maturation des différents os débute (figure 19 F). Au 45<sup>ième</sup> et 50<sup>ième</sup> jour, on remarque que la coloration du cartilage au niveau de la diaphyse des os des doigts semble diminuer au profit de l'épiphyse (figures 19 G-H). Dès le 55<sup>ième</sup> jour, les diaphyses ne sont plus constituées que d'une couche mince de cartilage et les épiphyses sont d'un bleu très intense (figures 19 I-J). Avec le temps, on voit apparaître dans les zones dépourvues de coloration bleue une fine coloration rosée. Cette coloration signifie que le tissu dans ces zones commence à être calcifié. La calcification complète des diaphyses ne se produit que sur les animaux les plus matures d'environ deux ans d'âge (figure 20). Le phénomène de la régénération des structures osseuses est donc bel et bien un phénomène intercalaire. De plus, le membre en régénération passe, tout comme le développement du membre, par une phase cartilagineuse pour ensuite être calcifié.

Avec ces nouveaux éléments, nous sommes maintenant plus en mesure de comprendre la mise en place des structures squelettiques autant lors du développement que lors de la régénération et de mettre ces résultats en parallèle avec ceux obtenus par les approches de biologie moléculaire.

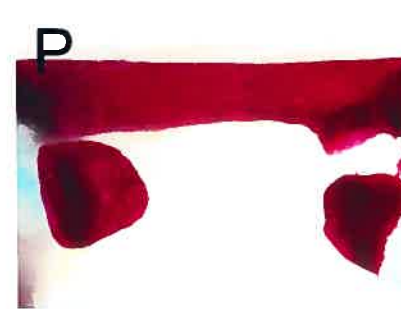
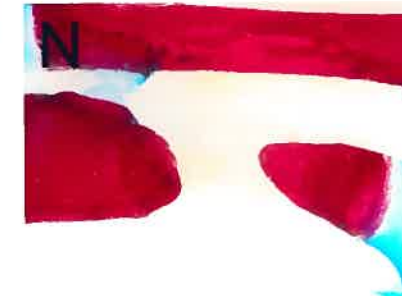
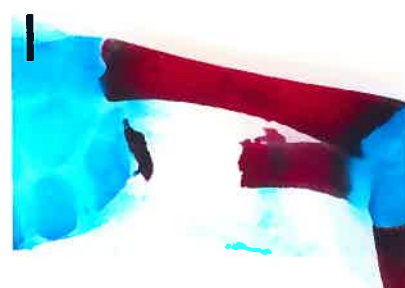
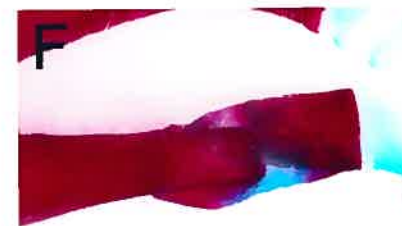
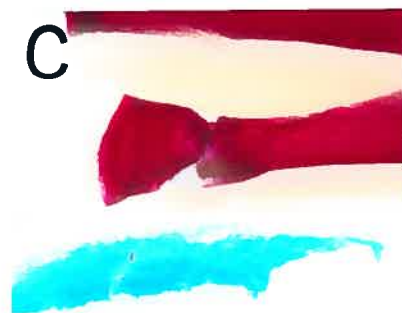
### 3.4.3 Les fractures jointes et non-jointes

L'axolotl possède des capacités de régénération exceptionnelles, elle peut ainsi reformer un membre amputé d'une manière parfaite. L'amputation est un traumatisme pour la patte de l'axolotl au même titre que la fracture ou l'excision d'un os ou d'une partie de celui-ci. Nous avons donc voulu savoir si l'axolotl est capable de régénérer aussi parfaitement ce type de traumatismes. En effet, nous avons causé des fractures jointes et

non-jointes sur l'un des deux os de l'avant-bras de l'axolotl, soit l'ulna ou le radius, et nous avons vérifié si celles-ci arrivent à régénérer ou du moins guérir ces blessures. Pour ce faire, nous avons fixé les pattes des animaux à différents temps après la chirurgie et nous avons utilisé sur celles-ci la technique de double coloration décrite plus haut. Les résultats pour les fractures jointes non-stabilisées sont présentés à la figure 21. La figure 21 A montre une patte 15 jours après l'inculcation de la fracture, on remarque à ce stade que la fracture est nette et donc qu'aucun processus de guérison n'est visible. Un mois plus tard, les deux extrémités des os sont désaxées et on remarque un halo bleuté autour du site de fracture. Cela signifie que des cellules d'origine cartilagineuses ont migré jusqu'au site de fracture et qu'un processus de guérison est mis en place (figure 21 B). Deux mois après la fracture, les os sont liés ensemble par une matrice cartilagineuse (figure 21 C). Au cours du prochain mois, la matrice entre les deux os va prendre de l'expansion et former ce que l'on appelle le cale mou qui entourera le site de fracture (figures 21 D-E). La figure 21 F, nous montre l'évolution du cale mou cartilagineux vers une matrice calcifiée. Cinq mois après, le cale mou est complètement remplacé par le cale dur : une enveloppe de matrice calcifiée qui soude de manière permanente les deux extrémités osseuses (figure 21 G). Après sept mois, l'os est complètement guéri et le cale osseux considérablement réduit grâce à l'action des ostéoclastes (figure 21 H). L'axolotl semble donc être capable de réparer les fractures jointes non-stabilisées via le processus de guérison osseuse que possèdent tous les autres vertébrés. Par contre, les vertébrés en général sont incapables de guérir les fractures non-jointes au-delà d'une dimension qui varie selon la grosseur de l'animal et à lequel on réfère comme dimension critique. Nous nous sommes donc interrogés sur la capacité que pourrait avoir l'axolotl à guérir ou régénérer ce type de fracture.

Des fractures non-jointes et non stabilisées ont donc été effectuées sur l'un des deux os de l'avant bras de l'animal. Les explants d'os retirés étaient tous au-delà de la longueur critique pour ce type d'os, soit 4 mm. Les résultats obtenus pour les fractures non-jointes et non-stabilisées sont présentés à la partie inférieure de la figure 21. Durant le premier mois et demi suivant la chirurgie, on remarque que la coupure sur les deux bouts d'os est franche et que contrairement à la fracture jointe, il n'y a pas de cellule de cartilage qui ont migré au site de fracture (figures 21 I-J). Durant les deux mois suivants, on ne dénote toujours pas de processus de guérison enclenché par la chirurgie et on remarque que les bouts d'os flottants se sont arrondis légèrement (figures 21 K-N). Cinq mois après l'intervention, l'un des deux bouts d'os, probablement à cause du frottement de celui-ci lors des mouvements de

**Figure 21 :** Double coloration sur des pattes ayant subi des fractures jointes non-stabilisées (en haut) et des fractures non-jointes non-stabilisées (en bas). A) et I) 15 jours après la chirurgie B) et J) 1 mois et demi C) et K) 2 mois D) et L) 2 mois et demi E) et M) 3 mois F) et N) 3 mois et demi G) et O) 5 mois H) et P) 7 mois



l'animal, semble vouloir fusionné avec l'autre os de l'avant-bras (figure 21 O). Finalement, sept mois après la chirurgie, il n'y a toujours pas de processus de guérison en route (figure 21 P). On peut donc conclure que l'axolotl ne peut pas, lui non plus, guérir ou régénérer les fractures non-jointes au-delà de la longueur critique.



## 4 Discussion

Depuis plusieurs années, de nombreuses études ont été effectuées afin de comprendre le processus complexe par lequel les urodèles amphibiens réussissent à régénérer un nombre impressionnant d'organes et de tissus y compris leurs membres en entier. Ces études furent surtout anatomiques à leurs débuts, mais l'avènement de la biologie moléculaire a permis d'étudier un tout autre aspect de ce phénomène unique : le rôle des gènes. Il est très important d'étudier la régénération sous l'angle de la biologie moléculaire car c'est, sans doute, à partir de l'action d'un ou de plusieurs gènes que le phénomène peut se mettre en place. La régénération de la patte implique le remplacement d'une multitude de tissus et types cellulaires, il paraît donc logique et important d'étudier les gènes qui sont responsables de la mise en place de ces différents tissus et cellules au cours du processus embryonnaire du développement de la patte. Parmi ces tissus, les structures squelettiques sont très importantes pour assurer un bon support mécanique de la patte. Il est donc important de bien connaître et caractériser le ou les gènes pouvant potentiellement être responsables de la régénération des tissus squelettiques. Dans cette étude, nous avons réussi à cloner et caractériser l'expression des trois gènes ciblés soit : *Sox-9*, *PTHrP* et *Cbfa-1*, qui ont des fonctions importantes lors du développement du squelette du membre chez les vertébrés.

### 4.1 Sox-9

#### 4.1.1 Développement

Les études d'hybridation in situ effectuées nous ont permis de déterminer le patron d'expression de *Sox-9* durant le développement de l'axolotl. Premièrement, nous avons observé qu'au stade 11 du développement de l'axolotl, correspondant à la gastrulation, aucune expression de *Sox-9* n'est observée. Ce résultat ne correspond pas à celui obtenu par Spokony *et al.* (2002) où ils ont pu observer un signal autour du blastopore de l'œuf de xénope [152]. Cette différence peut être due à une variation interspécifique de l'expression de *Sox-9* ou encore à une phase différente du stade de la gastrulation des embryons choisis. En fait, l'expression de *Sox-9* ne devient visible qu'au stade 16-17 (neurulation) du

développement de l'axolotl. Bien qu'à ce stade on soit encore loin de la mise en place des structures squelettiques, *Sox-9* exerce ici un rôle essentiel dans la mise en place du croissant neural. En effet, l'étude de Spokony *et al.* (2002), effectuée sur le xénope démontre que l'absence de *Sox-9* résulte en une perte prononcée des précurseurs des cellules de la crête neurale et en un développement anormal des structures squelettiques crâniennes [152]. Nous retrouvons le signal de *Sox-9* lors de la neurulation, strictement au niveau des bourrelets médullaires. Par contre, deux études portant sur le xénope, le retrouvent aussi au niveau des futures placodes otiques, non-loin des bourrelets médullaires [146, 152]. De plus, la majorité des signaux que nous avons obtenus sont de plus faible intensité que ceux présentés dans ces deux dernières études. Cette différence d'intensité peut s'expliquer par le fait que le laboratoire de Saint-Jeannet a utilisé une construction de *Sox-9* bâtie à partir d'une séquence de 1398 pb obtenue par PCR, alors que notre séquence fait seulement 471 pb. La longueur, les structures secondaires, de même que l'emplacement de la sonde à l'intérieur de la séquence de l'ARNm peuvent potentiellement venir influencer l'intensité du signal observé. L'expression de *Sox-9* se poursuit au niveau de la partie distale des bourrelets et plus tard au croissant neural, dans les stades 19-26, ces résultats sont corroborés par des études chez le poulet, la souris et le xénope [86, 146, 147, 152]. Lors de ces stades, *Sox-9* exerce son action pendant deux phases du processus de différenciation du croissant neural. Il est, tout d'abord, un important déterminant intrinsèque des cellules composant le croissant neural et possède une grande influence sur la destinée de différenciation des cellules qui s'y trouvent via l'induction de plusieurs signaux propres à la spécification de cette région, tels *Slug*, *Snail*, *Pax3*, *Msx-1* [147]. À la suite de ces stades, le signal s'atténue au niveau des régions du croissant neural et se concentre plutôt dans les régions des arcs pharyngiales, de la vésicule otique et de certaines parties du crâne. C'est aussi ce qui a été observé lors de quelques études, notamment chez le xénope et le poisson zèbre [74, 146, 152, 153]. En effet, Saint-Germain *et al.* (2004), qui ont étudié spécifiquement le rôle de *Sox-9* lors de la formation de l'oreille interne chez le xénope, en viennent à la conclusion que *Sox-9* est requis pour la spécification de la placode otique, structure qui donnera naissance à l'oreille interne [146]. Il n'est donc pas surprenant d'observer l'expression de *Sox-9* à cet endroit bien précis. L'expression présente dans les autres structures du crâne, tels les arcs pharyngiennes, s'explique par le fait que *Sox-9* est responsable de la migration d'une partie de la population des cellules du croissant neural. Cette population cellulaire sert à l'établissement des structures squelettiques crâniennes. Ce

qui explique pourquoi chez un patient atteint de la dysplasie campomélique, maladie relié à la perte de l'expression de *Sox-9*, on dénote d'importantes déformations crâniennes [152]. Au stade 37, nous observons également une expression localisée de *Sox-9* le long de la colonne vertébrale de l'embryon, au niveau des régions correspondant aux somites et aux futures vertèbres. Cela s'explique par les faits suivants : i) *Sox-9* est l'un des premier marqueur du sclérotome [86], une structure embryonnaire qui est responsable de la formation du cartilage au niveau du tronc de l'animal et donc des futures vertèbres [74]; ii) les somites déterminent le patron de migration des cellules de la crête neurale [151]; iii) les somites sont à l'origine des cellules qui forment les vertèbres et les côtes [151]. Suite à cette dernière affirmation, il est étonnant d'apprendre que *Sox-9* ne soit pas essentiel à la bonne formation du cartilage du tronc, contrairement à ce qui a été discuté précédemment pour les structures crâniennes [152]. En effet, une expérience de Spokony *et al.*(2002) a démontré l'existence de deux voies pour la formation des éléments dérivant de la crête neurale : une voie qui ne requiert pas l'action de *Sox-9*, responsable de la formation du tronc et une autre voie dépendante de *Sox-9* qui prend place lors de la formation des structures crâniennes [152]. Peu après, aux stades 41-42, l'expression du gène semble s'atténuer dans cette région. Cette diminution de signal a aussi été observée dans plusieurs autres études, il semble que le signal tend à disparaître peu après la fin de la déposition du cartilage qui formera la structure squelettique [74]. En fait, *Sox-9*, selon Wright *et al.*(1995), serait le responsable de l'initiation et du maintien de la chondrogénèse et non pas seulement un gène qui est exprimé suite à l'établissement de ce processus [74]. Une autre preuve que l'expression de *Sox-9* diminue avec la maturation du cartilage est fournie par Ng *et al.*(1997) qui démontrent que les chondrocytes hypertrophiés ne présentent aucun signal de *Sox-9* contrairement aux cellules du cartilage en prolifération [86]. Lors des derniers stades du développement de l'axolotl, nous remarquons une expression localisée de *Sox-9* sur la partie dorsale du crâne et plus intensément encore au niveau de la mandibule. Ces régions semblent correspondre à des zones de chondrogénèse intense pour la formation des os crâniens et de la mandibule. Les stades 0 à 42 décrits par Armstrong (1989) représentent tous les stades de développement de l'animal, excepté les stades de formation de la patte [42].

La formation des pattes est la dernière phase dans le processus de développement de la larve et c'est après sa sortie de l'œuf que ces dernières étapes se déroulent. Au cours, des premiers stades de développement de la patte (44-45), on ne distingue aucun signal de *Sox-*

9. En fait, il est normal à ce stade de ne voir aucune expression, car on ne peut pratiquement pas détecter la ceinture pectorale en formation avec une technique de coloration spécifique au cartilage, telle le Bleu de Victoria ou le Bleu d'Alcian [44]. Dans ce cas, on peut dire que le bourgeon du membre ne contient pas encore d'éléments cartilagineux [44]. Un peu plus tard, au stade 46, l'expression de *Sox-9* s'étend dans tout le bourgeon de la patte. La technique de double coloration (Bleu d'Alcian et Rouge Alizarin) que nous avons effectuée à ce stade ne nous permettait pas de distinguer l'ébauche d'humérus dont parle Nye *et al.*(2003). Par contre, plusieurs des éléments de la ceinture pectorale étaient observables (clavicule, omoplate, etc.). Une explication possible de cette disparité est la durée de ce stade qui est de 1 à 4 jours, il s'agit donc que la patte de l'animal soit un peu plus ou un peu moins avancée pour que l'humérus soit visible. Outre l'apparition de cartilage évidente à ce stade, une étude sur le poulet démontre que l'expression de *Sox-9* apparaît bien avant la formation de structures identifiables à l'intérieur de la patte [95]. En fait, *Sox-9* serait responsable de la différenciation des cellules du mésoderme en chondrocytes [85] et de l'agrégation de ces cellules pour initier la formation de cartilage [95]. Il est donc très plausible qu'on le retrouve exprimé aussi tôt au cours des phases de formation de la patte. Au cours de l'étape suivante du développement de la patte, au stade 47, l'humérus est présent et on aperçoit un signal qui semble beaucoup plus concentré à l'extrémité distale de la future patte. Cette région correspond à la différenciation du mésenchyme ou encore à la condensation du cartilage pour la formation du premier doigt. On peut observer le même patron d'expression dans deux autres études portant sur l'expression de *Sox-9* dans la patte de poulet, où les auteurs décrivent la région d'expression de *Sox-9* comme le futur domaine digital [85, 95]. Par contre, contrairement à l'observation effectuée par Chimal-Monroy *et al* (2003), le signal de *Sox-9* que nous avons obtenu au niveau du domaine digital de la patte ne se situe pas sur le bord postérieur de la patte, mais bien sur le bord antérieur [95].

Ceci nous amène à parler des différences de développement de la patte qui existent entre les urodèles amphibiens et les autres vertébrés. En effet, Shubin et Alberch (1986) ont démontré que les urodèles amphibiens développent leurs parties zeugopodiales (avant-bras) et autopodiales (poignet, main et doigts) selon un axe antéro-postérieure, contrairement aux autres vertébrés qui développent leurs membres selon un axe postéro-antérieur [154]. Ce phénomène paraît encore plus surprenant, car l'expression de plusieurs gènes de mise en place des patrons axiaux, tels *Hoxd-8*, *Hoxd-10*, *Hoxd-11* et *Shh*, est très conservée entre

tous les vertébrés, même l'axolotl [154, 155]. *Sox-9* n'est pas un gène reconnu pour avoir une quelconque influence lors de la détermination des axes, mais il est, par contre, responsable de la formation du cartilage. C'est donc pour cela qu'on le retrouve dans la région antérieure de la patte où le premier doigt va se former et non pas dans la région postérieure comme c'est le cas chez les autres vertébrés [95, 154]. Les doigts commencent à devenir évidents à partir du stade 49 où l'on voit apparaître les espaces interdigitaux. Par contre, il est encore impossible de colorer le cartilage des os des carpes et des métacarpes. À ce stade, l'expression de *Sox-9* est intense au bout des doigts, mais surtout au bout du doigt II qui se trouve, sans doute, dans une phase impliquant la formation de cartilage. En fait, comme l'ont remarqué Chimal-Monroy *et al* (2003), l'expression de *Sox-9* progresse postérieurement ou antérieurement selon l'espèce [95]. Ce même patron d'expression se confirme au cours des derniers stades de formation de la patte. On peut donc conclure que c'est presque qu'exclusivement dans les endroits où il y a beaucoup de chondrogénèse que l'expression du gène *Sox-9* est la plus forte, cela se traduit par un fort signal au niveau des bouts de doigts ainsi que des doigts en formation. C'est aussi ce qu'ont remarqué Wright *et al.* (1995) lors d'une étude sur le développement embryonnaire de la souris. En effet, l'une des principales conclusions de leur étude est que la disparition de *Sox-9* dans certaines régions telles les os longs et la partie proximale des doigts est due à la terminaison du processus de la chondrogénèse, où *Sox-9* ne serait plus requis.

#### 4.1.2 Régénération

Au cours des premières heures suivant l'amputation d'un membre, les principaux mécanismes qui se mettent en branle sont de nature inflammatoire [7, 32, 148]. Comme *Sox-9* ne possède jusqu'ici aucun rôle connu dans les mécanismes de réponses aux traumatismes, il est donc normal qu'aucun signal ne soit visible lors des 48 premières heures de la régénération. L'étude de double coloration que nous avons effectuée nous démontre que jusqu'au stade du bourgeon tardif, il n'y a aucune apparition de cartilage. Les études d'expression que nous avons effectuées sur des bourgeons primaires, nous permettent de constater une légère expression de *Sox-9* à ce stade. Pourtant aucun processus de formation de cartilage n'est détectable. Lisenmayer *et al.*(1976) et Tank *et al.*(1976), confirment tous deux, d'un point de vue histologique, qu'il n'y a aucun chondrocyte

présent dans le blastème [135, 148]. De plus, des évidences démontrent que les cellules qui composent le blastème de régénération sont en très grande majorité des cellules dédifférenciées d'origine dermique et musculaire qui se redifférencieront, au cours des stades plus avancés, en cartilage, muscles et derme [156]. Par contre, d'autres auteurs affirment que ce sont des cellules dédifférenciées de différentes origines qui composent le blastème [7, 32, 135]. Toutes ces évidences nous font douter de la valeur des résultats obtenus; pourquoi *Sox-9* serait-il exprimé dans un blastème encore loin du stade de l'ébauche des structures squelettiques? La réponse se trouve peut être dans le fait que, comme observé lors du stade 46 du développement de la patte, le signal de *Sox-9* vient bien avant la mise en place des structures squelettiques. C'est aussi ce qu'ont constaté Wright *et al.* (1995), lors du développement de la patte chez la souris, ils décrivent la situation ainsi : « une expression abondante de *Sox-9* précède clairement la déposition du cartilage en ces sites » [74]. Il ne faut pas oublier que *Sox-9* est l'un des premiers gènes à être exprimé à l'intérieur de la patte en développement. Lors de ces étapes, il a un rôle dans la condensation des cellules pluripotentes non-différenciées du mésenchyme qui formeront le cartilage [85, 157, 158], il n'est donc pas exclu de transposer ce rôle au processus de la régénération. On sait que certains *Bmps* active très fortement *Sox-9* lors des étapes de condensation du cartilage [85], l'une des avenues possibles pour poursuivre cette étude serait de caractériser l'expression de quelques-uns des membres de cette famille pour vérifier si ce phénomène est reproduit lors de la régénération. De plus, Wallace (1981) décrit une expérience où les quantités d'ARN et ADN ont été mesurées à différentes étapes de la régénération. Il semble qu'au stade du bourgeon primaire, la quantité d'ARN commence à augmenter de façon exponentielle pour atteindre un sommet au stade du bourgeon intermédiaire [7]. Ce phénomène explique peut être aussi l'apparition du signal à ce stade de la régénération, car la technique d'hybridation *in situ* interagit directement avec les ARN messagers. À l'étape suivante de la régénération, celle du bourgeon intermédiaire, le signal est très intense, en fait c'est à ce stade de la régénération que l'expression de *Sox-9* est la plus forte. Cela est peut être relié directement à la concentration des ARN messagers qui est à son maximum [7], mais une autre explication peut aussi être envisagée. En effet, d'un point de vue histologique, c'est à ce stade qu'il commence à y avoir déposition d'une matrice cartilagineuse autour de la partie amputée de l'os [148]. Concernant ce dernier point, il semble que *Sox-9* soit essentiel à la prolifération des chondrocytes [159] et à la conservation de cet état de division tout au long de la mise en place du cartilage [157]. À

cette étape-ci, il ne serait donc pas surprenant de constater l'expression d'un gène qui est un marqueur classique du cartilage : *Col2a1* dont *Sox-9* est l'activateur. L'étape du bourgeon tardif se distingue par une expression proximale de *Sox-9* par rapport au blastème. En effet, on remarque que le bout du blastème possède un signal moins fort que le reste. Cela s'explique par le fait qu'il y a une activité intense de différenciation du cartilage autour de la partie distale de l'os amputé. Par contre, à cette étape, la différenciation du cartilage dans le blastème n'a pas encore pris place donc l'expression de *Sox-9* à ce niveau est attribuée au phénomène de condensation des cellules pluripotentes d'origine mésodermique [85, 157, 158]. Plus tard, au stade palette, la différenciation du cartilage est amorcée et le signal que nous avons obtenu correspond bien avec les résultats obtenus par Tank *et al.* [148]. En plus de ce signal au milieu du blastème, nous constatons une expression de *Sox-9* à l'emplacement des futurs doigts. Ce signal est sans doute dû au processus de condensation des cellules préchondrocytaires tel que discuté précédemment. Le dernier stade de régénération étudié est celui de la différenciation des doigts. À ce stade, l'observation de l'expression diffuse de *Sox-9* aux parties plus proximales du blastème peut s'expliquer par le fait que *Sox-9* est encore actif pour le maintiens de la prolifération des chondrocytes, mais qu'à certains endroits, il n'est plus exprimé en raison de la mise en place d'une autre étape de la chondrogénèse : l'hypertrophie de certains chondrocytes. En effet, il a été démontré que les chondrocytes hypertrophiés n'expriment plus *Sox-9* [86]. L'étude de Tank vient confirmer cette hypothèse en faisant remarquer la mise en place d'une structure rudimentaire de cartilage évoluant de façon proximodistale [148]. L'expression intense de *Sox-9* au bout des doigts semble encore une fois être due aux rôles de *Sox-9* durant la chondrogénèse (condensation, différenciation, prolifération des chondrocytes). Cette expression localisée de *Sox-9* a aussi été observée chez plusieurs autres espèces, comme le poulet et la souris [74, 93, 95]. On retrouve également une expression très intense de *Sox-9* dans les espaces interdigitaux des doigts. Or, à ces endroits, il n'y a aucune mise en place ou encore croissance de cartilage. En fait, selon Akiyama *et al.* (2002), *Sox-9* semblerait avoir une fonction régulatrice sur certains gènes anti-apoptotiques tels *Chordin* et *Noggin*. En effet, *Sox-9* viendrait contrecarrer les actions pro-apoptotiques des *Bmps* qui sont responsables de former les espaces interdigitaux. *Sox-9* pourrait donc modérer l'action des *BMPs*, via une activation de certaines molécules anti-apoptotiques, avant que les structures cartilagineuses ne soient éliminées [157], ce qui expliquerait la présence de *Sox-9* dans les fosses des espaces interdigitaux.

## 4.2 PTHrP

### 4.2.1 Développement

Contrairement à ce que nous avons observé lors des premières phases de développement de la larve d'axolotl, Karaplis *et al.*(1994) relatent, quant à eux, une expression très précoce de *PTHrP* au niveau des dérivés endodermiques de la souris [101]. L'explication de cette différence vient peut être de la sensibilité de la technique utilisée et de certaines différences au niveau du développement embryonnaire des espèces étudiées. En effet, certaines techniques détectent la protéine et on sait maintenant que la forme sécrétoire de *PTHrP* est un petit peptide d'environ 36 acides aminés et qu'il exerce son action sous cette forme via une interaction avec son récepteur (voir Introduction). Or, la technique d'hybridation que nous utilisons détecte l'ARN messager de *PTHrP*, il se pourrait que cela ait un effet sur le degré de détection de ce gène. En fait, selon nos analyses, *PTHrP* ne présente qu'un très faible signal lors du développement. Son expression semble débiter au stade 43-44, où l'on peut constater un signal au niveau du crâne et de la colonne vertébrale. Pour tenter d'expliquer le signal de *PTHrP* au niveau du crâne, il est important d'analyser les études de mutations nulles pour ce gène effectuées sur d'autres espèces. Karaplis *et al.*(1994) obtient une forme très arrondie et plus petite du crâne dans le cas de mutants nuls, il semble donc que *PTHrP* a un rôle à jouer lors de la formation de cette structure [101, 109]. De plus, Cormier *et al.*(2003) ont rapporté le même type de signal que nous avons obtenu au niveau de certaines structures du crâne, de même que dans plusieurs cellules d'origine ectodermique chez les fœtus humain [160]. Les cellules d'origine ectodermiques formeront des structures tels : le crâne, les dents, plusieurs glandes et ganglions ainsi que plusieurs épithéliums de surface [151]. En effet, dans une étude d'expression de *PTHrP* chez le rat, Lee *et al.*(1995), signalent l'expression de ce gène au niveau des dents, de plusieurs épidermes, de l'oreille interne, de l'épithélium des cavités nasales et du plexus choroïde [116]. C'est sans doute pourquoi nous détectons un signal au niveau de la bouche de l'embryon, de quelques parties du crâne (non-identifiées), de la colonne vertébrale ainsi qu'au niveau de certaines structures abdominales (non-identifiées). Pour ce dernier point, Lee *et al.*(1995), ont effectivement détecté l'expression de *PTHrP* immédiatement sous l'épithélium des parois intestinales du fœtus de rat [116].



La localisation de *PTHrP* à cet endroit s'explique par le fait que cette molécule est un relaxant musculaire reconnu [161]. De plus, l'article de Cormier *et al.*(2003), signalent l'expression de *PTHrP* au niveau des épithéliums de différentes glandes et des cellules endocardiques, nous n'avons pas pu corroborer ces résultats chez l'axolotl [160].

Lors du développement de la patte de l'axolotl, on ne constate aucun signal de *PTHrP* au cours des premiers stades. Pourtant, plusieurs articles confirment l'importance de *PTHrP* pour le maintien de l'état prolifératif des chondrocytes, de même que dans les muscles squelettiques, cette fois-ci, pour son action de relaxant musculaire [161, 162]. Il serait probable, selon l'article de Philbrick *et al.*(1996), que l'expression de *PTHrP* soit présente dans le mésenchyme immature mais de façon transitoire et qu'elle disparaisse ensuite jusqu'à l'étape où le chondrocyte devient hypertrophique [97]. Il est donc plausible que les pattes fixées à certains moments précis de la régénération, ne correspondent pas aux périodes d'expression de *PTHrP*. Il est aussi possible que le signal soit présent, mais en si faible intensité qu'il nous soit impossible de le voir ou de le détecter. C'est d'ailleurs ce qu'ont fait remarquer plusieurs études portant sur l'expression des ARNm de *PTHrP*, qui concluent que *PTHrP* est présent dans presque tous les tissus, mais qu'il est limité à certains types cellulaires à l'intérieur de ces tissus. L'autre explication que nous pouvons apporter ici : est que, l'ARNm et la protéine de *PTHrP*, sont présents en si faible quantité qu'il faut une méthode très sensible pour les détecter. De plus, il a été montré que les ARNm de *PTHrP* possèdent une certaine séquence qui mène à la rapide dégradation de ceux-ci et qu'ils auraient une durée de vie se situant entre 30 minutes et 3 heures [97]. Cela pourrait amener un élément de réponse en ce qui concerne les faibles intensités d'expression obtenues dans nos expériences. Lors des stades plus avancés du développement de la patte (51-52), on peut apercevoir un faible signal au bout des doigts en formation. C'est aussi ce qu'a remarqué Lee *et al.*(1995), lors de son étude chez le rat, qui situe le signal de *PTHrP* dans certaines régions périphériques du cartilage primordial au bout des doigts, ainsi que dans les os à des temps et des emplacements différents selon leurs stades de maturation [116]. La présence de *PTHrP* à ces endroits est due à la forte activité proliférative des chondrocytes qui s'y déroule. Mais il ne faut pas oublier aussi que les os des métacarpes doivent encore croître en longueur [97, 116].

#### 4.2.2 Régénération

Contrairement à la faible expression de *PTHrP* lors des stades du développement de la patte, le signal de *PTHrP* lors de la régénération est très intense. On peut émettre l'hypothèse que durant la régénération, le blastème est le lieu d'une activité mitotique intense et que les quantités d'ARN totaux y sont beaucoup plus importantes [7], il se peut donc que l'expression des ARNm de *PTHrP* y soit beaucoup plus intense que lors du développement de la patte. L'expression de *PTHrP* semble s'établir aussitôt que le blastème de régénération devient visible, c'est-à-dire au stade du bourgeon primaire [148]. À ce stade, le blastème démontre une très forte activité mitotique, ce qui pourrait expliquer la détection de l'expression élevée de *PTHrP*. Il est aussi possible que ce soit l'activité intense des ostéoclastes qui soit responsable de la forte présence de *PTHrP* à cet endroit. En effet, les ostéoclastes doivent retirer les débris d'os et de cartilage qui ont été générés lors de l'amputation. Il a été démontré que *PTHrP* est indirectement relié à l'activation des ostéoclastes responsables du remodelage osseux et cartilagineux [163, 164]. À l'étape du bourgeon intermédiaire, les cellules ostéoclastiques déclinent et sont remplacées par les chondrocytes qui commencent à se déposer à proximité de l'os amputé [148]. À ce moment, l'expression de *PTHrP* est à son sommet, on peut expliquer ce signal par la mise en place des structures cartilagineuses. En effet, à ce stade, la majorité des cellules composant le blastème sont encore indifférenciées : et tel qu'il a été discuté antérieurement, l'expression de *PTHrP* est effectivement associée au mésenchyme non-différencié qui formera les chondrocytes [97, 116]. Il semble, en effet, que *PTHrP* soit responsable de la régulation de *Ihh* qui permet la différenciation des cellules du mésenchyme en chondrocytes. Au stade du bourgeon tardif, l'expression de *PTHrP* a diminué d'intensité et est surtout concentrée dans la partie basale du blastème. Plusieurs groupements de cellules se sont formés et il est possible, selon Tank (1976) de distinguer les cellules pré-cartilagineuses, ce qui pourrait expliquer la présence de *PTHrP* [148]. Au stade palette, l'expression de *PTHrP* se situe au niveau des structures cartilagineuses. En fait, c'est à ce stade que la différenciation du cartilage débute [148]. Plusieurs expériences sur le développement embryonnaire d'autres vertébrés ont démontré qu'effectivement, *PTHrP* semble agir sur *Ihh* pour permettre cette différenciation des cellules pré-cartilagineuses en chondrocytes [116, 118, 165]. Au stade de la différenciation des doigts, l'expression de *PTHrP* est concentrée surtout dans les régions autour des doigts et des futurs doigts.

L'expression de ce gène à cet endroit est probablement reliée à l'intense prolifération des chondrocytes qui s'y déroule, car *PTHrP* et *Ihh* contrôlent la destinée proliférative des chondrocytes à l'intérieur des os en formation [115, 116, 118]. Le signal qui se situe sur le contour des doigts peut s'expliquer de deux manières. Premièrement, il est important de se rappeler que *PTHrP*, bien que reconnu pour son action lors de la chondrogénèse, est aussi impliqué dans la mise en place et le fonctionnement des tissus musculaires [97]. L'expression que nous apercevons le long des doigts peut donc être due à la mise en place des muscles squelettiques en ces endroits, c'est d'ailleurs à ce stade que les cellules musculaires apparaissent au niveau du membre en régénération [148]. Il est aussi possible qu'à ce moment, *PTHrP* exerce son action régulatrice sur la maturation des chondrocytes en maintenant ceux-ci dans un état de prolifération. Cela permettrait aux os composant les doigts de s'allonger ou de s'élargir de façon à atteindre la taille optimale [115, 162, 165, 166]. Il a été prouvé que si *PTHrP* est muté, il se produit une maturation trop rapide des chondrocytes ce qui résulte en la formation de plusieurs os anormaux et plus petits [114, 118]. En plus de tous ces rôles au niveau de la croissance des os et de la régulation de la différenciation des chondrocytes, il semble que *Sox-9* soit une cible de *PTHrP* qui servirait à réguler le rôle de celui-ci dans l'arrêt de la maturation des chondrocytes pour éviter que ceux-ci deviennent hypertrophiques [166]. Ce dernier élément expliquerait peut être pourquoi les patrons d'expression des deux gènes, lors du stade de différenciation des doigts, sont très semblables au contour des doigts.

### 4.3 Cbfa-1

#### 4.3.1 Développement

Durant le développement de l'axolotl, l'expression de *Cbfa-1* ne débute qu'à un stade très avancé. Il semble que ce gène soit exprimé qu'à partir du stade 43 et ce, en étant restreint au niveau de la colonne vertébrale et du crâne de l'animal. L'expression au niveau du crâne est due au rôle essentiel que semble tenir *Cbfa-1* dans le processus de fermeture des fontanelles crâniennes. En effet, chez les souris mutantes nulles pour ce gène, une des principales caractéristiques anatomiques est que les fontanelles ne se ferment pas [127]. À un stade plus avancé, on constate une expression de *Cbfa-1* au niveau de toute la partie antérieure de l'animal, c'est aussi ce qu'a remarqué Stricker *et al.*(2002) lors de l'étude de

ce gène chez la souris [130]. Cette expression au niveau de la tête peut être expliquée par le fait que pratiquement tous les os du crâne sont formés par le processus d'ossification intramembranaire, processus impliquant la différenciation directe des cellules du mésenchyme en ostéoblastes. Plusieurs études ont effectivement prouvé que *Cbfa-1* est nécessaire au processus de différenciation des cellules mésenchymateuses ou chondrocytaires en ostéoblastes. Ces études ont utilisé des mutants nuls pour prouver qu'en l'absence de *Cbfa-1*, il n'y a pas formation de structure osseuse et ce, dans l'ensemble du squelette de l'animal [77, 127, 130]. C'est d'ailleurs aussi ce qui pourrait expliquer la présence de signal pour *Cbfa-1* au niveau de la colonne vertébrale où celui-ci participe, via la différenciation des chondrocytes en ostéoblastes, au processus d'ossification des vertèbres [129].

Durant les étapes de développement de la patte, on remarque une forte expression de *Cbfa-1* tout au long du processus. L'expression de *Cbfa-1* au cours des premiers stades du développement de la patte, peut s'expliquer par le fait que ce gène semble être exprimé lors de l'étape de condensation des cellules du mésenchyme, il participerait ainsi à la différenciation des cellules précurseurs du cartilage et de l'os [124, 127, 150]. De plus, Mundlos *et al.* soulèvent l'hypothèse qu'il pourrait être impliqué dans le processus qui vise à donner la bonne forme à certaines structures squelettiques [126]. Un peu plus tard au cours du développement de la patte, c'est surtout au niveau de la partie distale des futurs doigts que l'on observe le signal de *Cbfa-1*. À ce stade du développement des doigts, celui-ci semble impliqué dans la coordination des événements responsables de la prolifération et de la maturation des chondrocytes [167]. Tel que discuté antérieurement, le bout des doigts en formation est un lieu propice à la différenciation et la prolifération des chondrocytes. Les stades de développement de la patte qui suivent sont caractérisés par une très forte expression de *Cbfa-1* au niveau des phalanges, métacarpes et de plusieurs autres os. Il semble, selon l'analyse qu'en font Stricker *et al.* (2002) chez la souris, que les régions de forte expression correspondent à des zones responsables de la production des nouveaux chondrocytes. Ces zones, correspondant au périchondrium, semblent approvisionner l'os en formation d'éléments de structures [150]. Ces régions sont donc propices à des événements de condensation, maturation et prolifération des chondrocytes et, par le fait même, à l'expression de *Cbfa-1* [150, 167]. De plus, l'expression que nous pouvons distinguer au niveau de l'humérus, du radius et de l'ulna est sans doute due à la présence de structures squelettiques plus matures (calcifiées) à ces endroits. Cette hypothèse est soutenue par Nye

*et al.* qui ont observé, à ce stade du développement de la patte, la coloration de ces structures au rouge alizarin qui détecte les tissus calcifiés [44]. Il a aussi été démontré que *Cbfa-1* est également exprimé au niveau des ostéoblastes et des chondrocytes hypertrophiques chez la souris, cellules que l'on retrouve généralement à la diaphyse de l'os en formation, région qui correspond à la partie plus mature de l'os [134]. De plus, *Cbfa-1* semble posséder un rôle dans l'initiation et le maintien de l'état hypertrophique des chondrocytes [134].

#### 4.3.2 Régénération

Durant la régénération, l'expression de *Cbfa-1* arrive plus tard que les autres gènes étudiés jusqu'ici. L'absence de *Cbfa-1* lors des stades tels le bourgeon primaire et le bourgeon intermédiaire peut s'expliquer par le fait que ce n'est qu'au stade de la différenciation des chondrocytes en ostéoblastes que son action est requise, contrairement aux stades précédents où son rôle est beaucoup moins bien connu [129]. Il serait donc possible que *Cbfa-1* soit exprimé plus tôt, mais que son signal soit de si faible intensité qu'il reste indétectable avec la technique d'hybridation *in situ* que nous utilisons. C'est au stade du bourgeon tardif que nous pouvons remarquer une très faible expression de *Cbfa-1* au niveau de la partie proximale du blastème. À ce stade, il y a début de la différenciation du cartilage au niveau du périoste de l'os amputé [148], il n'est donc pas surprenant de constater l'expression de *Cbfa-1* dans cette région étant donné son rôle lors de la différenciation des cellules chondrocytaires [128, 150]. Au stade de palette, on peut constater que le patron d'expression de *Cbfa-1* est semblable à celui que l'on retrouve lors du développement de la patte, c'est-à-dire que le signal est concentré dans la partie distale du blastème où apparaîtront les futurs doigts, de même qu'au niveau des métacarpes. Le stade palette indique aussi le début de la différenciation du cartilage au niveau du squelette zeugopodial de la patte et donc au niveau des os de l'avant-bras [148]. L'expression de *Cbfa-1* lors de ce stade est tout à fait justifiable, de par son rôle lors de ce processus [128]. Un peu plus tard, lors du stade de différenciation des doigts, on peut remarquer que le signal reflète encore ce que l'on avait obtenu lors du développement de la patte, c'est-à-dire qu'on le retrouve aux extrémités distales des phalanges, au niveau du périchondrium des métacarpes de même qu'aux diaphyses de certains os. Il se peut donc que l'expression de

*Cbfa-1* relève de son implication lors de la différenciation des chondrocytes, de leur prolifération de même qu'au niveau de la différenciation des ostéoblastes et du maintien des chondrocytes hypertrophiques, cellules qui sont toutes deux responsables de la calcification du tissu cartilagineux [77, 124, 128, 130, 134]. Il y a donc des évidences de l'implication de *Cbfa-1* autant lors de la chondrogénèse que lors de la mise en place des bases pour l'ossification et la calcification. Par contre, dans leur étude descriptive des différents stades de régénération de l'axolotl, Tank *et al.*(1976) affirment que la partie régénérée, malgré son apparence mature, va conserver assez longtemps un squelette cartilagineux [148]. Dans ce cas-ci, l'expression de *Cbfa-1* dans les diaphyses serait expliquée par la présence de chondrocytes hypertrophiés et non par celle des ostéoblastes en différenciation [134]. L'expression plus faible de *Cbfa-1* lors des stades de la régénération comparée aux phases de développement de la patte, peut être due à une différence de l'intensité d'expression de ce gène entre ces deux processus et à la présence de tissus beaucoup plus matures sur la patte en régénération. Ce dernier élément implique la présence de beaucoup plus de matrice extracellulaire et de couches de cellules pouvant venir faire écran à des signaux de plus faible intensité.

Les résultats obtenus précédemment pour les études spatiales d'expression des trois gènes à l'étude, nous confirment des patrons d'expression propres à chacun de même que des signaux d'intensité particuliers aux gènes et au stade du développement ou de la régénération chez l'axolotl. Des études complémentaires par RT-PCR sont planifiées pour s'assurer de la correspondance des signaux observés à l'hybridation *in situ* et de ceux observés lors des hybridations Northern pour tous les gènes.

#### **4.4 Fractures jointes non-stabilisées et non-jointes non-stabilisées**

L'axolotl possède une très grande capacité de régénérer la totalité des tissus composant le membre amputé. Il est donc normal de se demander si cet animal est capable de reformer certains éléments manquants de ses pattes. Dans le cas d'une fracture par exemple : l'axolotl est reconnue pour régénérer les blessures de sa peau, il serait normal de se poser la question si oui ou non l'axolotl utilisera la régénération pour « guérir » la fracture. Les résultats obtenus lors de cette étude, nous prouvent que l'axolotl, tout comme les autres vertébrés, guérit ses fractures non-stabilisées par le processus de formation de

cale de cartilage qui sera ensuite remplacé par de la matrice osseuse [139]. On remarque effectivement la formation progressive d'une enveloppe de cartilage autour du site de fracture qui sera remplacé éventuellement par de l'os. Pour ce qui est des fractures non-jointes de dimension critique, on a remarqué que l'axolotl est incapable de réparer l'espace laissé entre les deux extrémités des os et ce même après sept mois. L'axolotl n'utilise donc pas la régénération pour réparer ses fractures. Plusieurs expériences d'extirpations d'os de la patte d'axolotl ont été réalisées, et une seule conclusion en ressort : l'axolotl adulte est incapable de remplacer un os manquant [7]. On peut tenter de trouver des éléments de réponses qui nous aiderait à comprendre pourquoi un animal doté d'un outil aussi puissant que la régénération ne s'en sert pas dans les cas de fractures jointes ou non-jointes. Tout d'abord, après la chirurgie causant la fracture, il n'y a pas de plaie ouverte comme à l'amputation, il n'y a souvent aucun saignement et les tissus périphériques du site de fracture ne subissent aucun traumatisme. Ce mode de chirurgie, ne permet pas la mise en place de l'épithélium de guérison nécessaire au processus de régénération de par les interactions épithélio-mésenchymateuses qu'il crée [7]. Cette explication n'est toutefois pas suffisante, puisque lors de l'ablation d'une partie du cœur, les chirurgies sont exécutées de façon semblable et l'axolotl régénère la partie manquante de son cœur [9]. Une autre expérience semble soutenir l'hypothèse que l'amputation, crée un fort traumatisme des tissus environnants qui est nécessaire pour régénérer les éléments squelettiques. Effectivement, Goss (1969) a démontré que lorsque l'on ampute la patte dans la partie où l'os a été extirpé, la section qui repousse contient l'autre moitié de l'os extirpé sans que la base de l'os ne soit présente [7]. De plus, cette expérience démontre que les cellules composant les structures squelettiques déjà en place, dans la partie restante de la patte amputée, semblent peu impliquées dans le processus de la régénération [156]. Cette hypothèse a été vérifiée lors de deux études portant sur l'axolotl. Lheureux (1971) et l'équipe de Dunis (1961), ont démontré que suite à la greffe d'un morceau de peau (derme et épiderme), sur un membre irradié qui est incapable de régénérer, il y a régénération parfaite de toutes les structures sauf des muscles. Ces expériences démontrent qu'à elle seule la peau possède tout ce qui est requis, sauf les cellules capables de faire les muscles, pour assurer la régénération parfaite du membre [168, 169]. La présence de cellules différenciées, ou capables de le faire au site d'amputation, est aussi un autre facteur qu'il faut considérer. En effet, des expériences de fractures non-jointes chez le lapin ont démontré que l'ajout de cellules de la moelle osseuse couplé à *TGFβ* au site de fracture

améliorent beaucoup les chances de guérison pour ce type de traumatisme [142]. De plus, il semble nécessaire pour guérir une fracture qu'il y ait contact mécanique entre les deux extrémités de l'os, ce contact permettrait d'initier les mécanismes de guérison [143]. En plus de tous ces éléments pour tenter d'expliquer pourquoi l'axolotl est incapable de régénérer les éléments de son squelette uniquement, il ne faut pas oublier l'action sans doute essentielle des gènes lors des processus de guérison autant que de régénération. En effet, comme il a été largement discuté plus tôt, certains gènes semblent avoir un rôle essentiel lors du processus du développement de l'embryon ainsi que lors de la régénération. Il en est de même pour la guérison des fractures, ainsi plusieurs études ont attribué à certains gènes tels : les *BMPs*, *Cbfa-1*, les *TGFβs*, *Ihh*, etc. des fonctions importantes lors de ce processus [139-141, 143]. Des études d'expression de certains de ces gènes durant la guérison des fractures pourraient nous permettre de mieux comprendre ce mécanisme chez l'axolotl et ainsi tenter de mettre en lumière les différences moléculaires entre ce processus et celui de la régénération du membre.



## 5 Conclusions et perspectives

Depuis plusieurs années déjà, l'axolotl est un animal qui suscite beaucoup de fascination et, à n'en pas douter, continuera d'être un objet d'étude qui soulèvera des questions encore très longtemps. En effet, très peu de choses sont connus sur les mécanismes moléculaires qui permettent à cet animal de régénérer plusieurs de ces structures. L'étude menée ici nous apporte quelques réponses sur certains des gènes pouvant être impliqué dans le processus de régénération des structures osseuses.

L'étude de l'expression de *Sox-9*, nous a permis de constater que ce gène est omniprésent autant lors du développement de l'axolotl que lors des différents stades de la régénération de ses membres. De plus, son expression soutenue lors des derniers stades de la régénération nous confirme l'implication de ce gène lors des processus de mise en place du cartilage. Quant au gène *PTHrP*, il n'est exprimé qu'à des moments bien précis du développement et son expression lors de la régénération est soutenue de l'apparition du blastème jusqu'à la fin du processus. Il semble donc que *PTHrP* possède des rôles complètement différents lors du développement et de la régénération, où il pourrait être responsable de l'activation des ostéoclastes et du maintien de la prolifération de chondrocytes. Le dernier gène étudié est *Cbfa-1*, très peu présent lors du développement, il est cependant exprimé très fortement lors des stades de développement de la patte (47-53). Durant la régénération, le patron d'expression de ce gène ressemble beaucoup à celui obtenu lors du développement de la patte. On peut donc penser que *Cbfa-1* possède un rôle certain dans la mise en place et le maintien à long terme des structures cartilagineuses autant lors du développement que lors de la régénération. Un autre aspect du projet visait à caractériser le processus de guérison des fractures jointes et non-jointes chez l'axolotl. Les résultats obtenus nous confirme que l'axolotl guérit bel et bien ses fractures jointes comme les autres vertébrés, c'est-à-dire par la formation d'un cale et que cet animal ne semble pas en mesure de guérir ou même régénérer les fractures non-jointes.

Bien que l'étude effectuée nous a permis d'en apprendre davantage sur les mécanismes de guérison des traumatismes osseux de même que sur les patrons d'expression des trois gènes à l'étude durant la régénération, encore beaucoup de questions restent sans réponse. Pour tenter de répondre à une partie de ces questions, des études plus approfondies d'expression géniques et protéiques à l'aide de tissus sectionnés sur certaines

parties de l'axolotl sont nécessaires. Ces études d'expression devraient porter autant durant les différents stades de la régénération, du développement, qu'au cours des phases de guérison osseuse pour compléter les études de caractérisation menées jusqu'ici. De plus, la caractérisation de la fonction de *Sox-9*, *PTHrP* et *Cbfa-1*, à l'aide de vecteurs viraux fonctionnels chez l'axolotl, pourraient venir faire la lumière sur les véritables implications de ces gènes durant ces processus.

## 6 Bibliographie

1. Ferchault de Réaumur, R.-A., in *Mem. Acad. Roy. Sci.* 1712. p. 223-245.
2. Dinsmore, C.E. and American Society of Zoologists., *A History of regeneration research : milestones in the evolution of a science.* 1st ed. 1991, Cambridge [England] ; New York: Cambridge University Press. x, 228 p.
3. Lenhoff, S.G., H.M. Lenhoff, and A. Trembley, *Hydra and the birth of experimental biology, 1744 : Abraham Trembley's Mâemoires concerning the polyps.* 1986, Pacific Grove, CA: Boxwood Press. xvi, 60, x, 192 p.
4. Darwin, C. and E. Dieffenbach, *Charles Darwin's.* 1844, Braunschweig.: F. Vieweg und sohn. 2 v. in 1.
5. Spallanzani, L., *Prodromo sa un Opera da Imprimersi sopra le Riproduzioni animali.* Modena, 1768. 7.
6. Wolpert, L., *Principles of development.* 1998, London ; New York Oxford ; New York: Current Biology ;Oxford University Press. xx, 484.
7. Wallace, H., *Vertebrate limb regeneration.* 1981, Chichester Eng. ; New York: Wiley. xii, 276.
8. Morgan, T.H., *Regeneration.* 1901, New York,London,: The Macmillan Company; Macmillan & Co., ltd. xii p., 1 l., 316 p.
9. Brockes, J.P., *Amphibian limb regeneration: rebuilding a complex structure.* Science, 1997. **276**(5309): p. 81-7.
10. Slack, J.M., *Regeneration research today.* Dev Dyn, 2003. **226**(2): p. 162-6.
11. Pallas, P.S., *Miscellanea zoologicam quibus novae imprimis atque obscurae animalium species.* 1766.
12. Newmark, P.A. and A. Sanchez Alvarado, *Not your father's planarian: a classic model enters the era of functional genomics.* Nat Rev Genet, 2002. **3**(3): p. 210-9.
13. Wollf E., D.F., *Suy la migration des cellules de regeneration chez les planaries.* Rev. Suisse Zool., 1948. **55**: p. 218-227.
14. Morgan, T.H., *Experimental studies of the regeneration of planaria maculata.* Arch. Entwm Org., 1898. **7**: p. 364-397.
15. Morgan, T.H., *Regeneration in planarian.* Arch. Entwm. Org., 1900. **10**: p. 58-117.

16. Morgan, T.H., *The control of heteromorphosis in planaria maculata*. Arch. Entwm. Org., 1903. **14**: p. 683-695.
17. Agata, K. and K. Watanabe, *Molecular and cellular aspects of planarian regeneration*. Semin Cell Dev Biol, 1999. **10**(4): p. 377-83.
18. Tanaka, E.M., *Regeneration: If they can do it, why can't we?* Cell, 2003. **113**: p. 559-562.
19. Marsh, J.L. and H. Theisen, *Regeneration in insects*. Semin Cell Dev Biol, 1999. **10**(4): p. 365-75.
20. Brockes, J.P., *Regeneration and cancer*. Biochim Biophys Acta, 1998. **1377**(1): p. M1-11.
21. Goss, R.J., *Principles of Regeneration*. 1969, New York: Academic Press.
22. Stocum, D.L., *Vertebrate regeneration*. Semin Cell Dev Biol, 2002. **13**(5): p. 325-6.
23. Mizell, M., *Limb regeneration: induction in the newborn opossum*. Science, 1968. **161**(838): p. 283-6.
24. Mizell, M. and J.J. Isaacs, *Induced regeneration of hindlimbs in the newborn opossum*. American Zoologist, 1970. **10**(2): p. 141-55.
25. Illingworth, C.M., *Trapped fingers and amputated finger tips in children*. J Pediatr Surg, 1974. **9**(6): p. 853-58.
26. Court, F.G., et al., *The mystery of liver regeneration*. British Journal of Surgery, 2002. **89**(9): p. 1089-95.
27. Fausto N., J.S.C., *The role of hepatocytes and oval cells in liver regeneration and repopulation*. Mech Dev, 2003. **120**: p. 117-130.
28. Zimmermann, A., *Liver regeneration: the emergence of new pathways*. Medical Science Monitor, 2002. **8**(3): p. RA53-63.
29. Columbano, A. and H. Shinozuka, *Liver regeneration versus direct hyperplasia*. FASEB Journal, 1996. **10**(10): p. 1118-28.
30. Kountouras, J., P. Boura, and N.J. Lygidakis, *Liver regeneration after hepatectomy*. Hepato-Gastroenterology, 2001. **48**(38): p. 556-62.
31. Gardiner, D.M., T. Endo, and S.V. Bryant, *The molecular basis of amphibian limb regeneration: integrating the old with the new*. Semin Cell Dev Biol, 2002. **13**(5): p. 345-52.
32. Gardiner, D.M., M.R. Carlson, and S. Roy, *Towards a functional analysis of limb regeneration*. Semin Cell Dev Biol, 1999. **10**(4): p. 385-93.

33. Voss, K., Maness, Smith, Rondet, Quigley, Bryant, Gardiner, Parichy, *Comparative EST Analysis of regeneration: Axolotl limbs Vs Zebrafish Fin*. GeneBank, 2002.
34. Roy, S. and D.M. Gardiner, *Cyclopamine induces digit loss in regenerating axolotl limbs*. J Exp Zool, 2002. **293**(2): p. 186-90.
35. Dent, J.N., *Limb regeneration in larvae and metamorphosing individuals of the South African clawed toad*. J. Morph., 1962. **110**: p. 61-77.
36. Muneoka, K., G. Holler-Dinsmore, and S.V. Bryant, *Intrinsic control of regenerative loss in Xenopus laevis limbs*. J. Exper. Zool., 1986. **240**: p. 47-54.
37. Wolfe, A.D., H.L. Nye, and J.A. Cameron, *Extent of ossification at the amputation plane is correlated with the decline of blastema formation and regeneration in Xenopus laevis hindlimbs*. Dev Dyn, 2000. **218**(4): p. 681-97.
38. Muneoka, K. and D. Sassoon, *Limb development and regeneration*. Dev. Biol., 1992. **152**: p. 37-49.
39. Brockes, J.P. and A. Kumar, *Plasticity and reprogramming of differentiated cells in amphibian regeneration*. Nat Rev Mol Cell Biol, 2002. **3**(8): p. 566-74.
40. Safi, R., et al., *The axolotl (Ambystoma mexicanum), a neotenic amphibian, expresses functional thyroid hormone receptors*. Endocrinology, 2004. **145**(2): p. 760-72.
41. Belkin, R.I., *Osnovnye polozheniia michurinskogo ucheniia*. 1950. 102, [2] p.
42. Armstrong, J.B. and G.M. Malacinski, *Developmental biology of the axolotl*. 1989, New York: Oxford University Press. xi, 320.
43. Malacinski, G.M., Duhon, ST., *Developmental biology of urodeles*. Int J Dev Biol, 1996. **40**: p. 915-916.
44. Nye, H.L., et al., *Extending the table of stages of normal development of the axolotl: Limb development*. Dev Dyn, 2003. **226**(3): p. 555-60.
45. Nye, H.L., et al., *Regeneration of the urodele limb: A review*. Dev Dyn, 2003. **226**(2): p. 280-94.
46. Iten, L. and S.V. Bryant, *Forelimb regeneration from different levels of amputation in the newt, Notophthalmus viridescens*. Wilhelm Roux Archiv., 1973. **173**: p. 263-282.
47. Stocum, D.L., *Limb regeneration: A call to arms (and legs)*. Cell, 1991. **67**: p. 5-8.
48. Geraudie, J. and P. Ferretti, *Gene expression during amphibian limb regeneration*. Int Rev Cytol, 1998. **180**: p. 1-50.

49. Echeverri, K. and E.M. Tanaka, *Ectoderm to mesoderm lineage switching during axolotl tail regeneration*. Science, 2002. **298**(5600): p. 1993-6.
50. Stocum, D.L. and G.E. Dearlove, *Epidermal-mesodermal interaction during morphogenesis of the limb regeneration blastema in larval salamanders*. J. Exp. Zool., 1972. **181**: p. 49-62.
51. Carrington, J.L. and J.F. Fallon, *Initial limb budding is independent of apical ectodermal ridge activity; evidence from a limbless mutant*. Development, 1988. **104**: p. 361-367.
52. Yang, E.V., et al., *Expression of Mmp-9 and related matrix metalloproteinase genes during axolotl limb regeneration*. Dev Dyn, 1999. **216**(1): p. 2-9.
53. Globus, M., *Neurotrophic contribution to a proposed tripartite control of the mitotic cycle and cartilage differentiation in regeneration blastemata in the newt*. American Zoologist, 1978. **18**: p. 855-868.
54. Tsonis, P.A., *Limb Regeneration*. 1996, Cambridge University Press. 241.
55. Lo, D.C., F. Allen, and J.P. Brookes, *Reversal of muscle differentiation during urodele limb regeneration*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1993. **90**(15): p. 7230-4.
56. Lheureux, E., *Importance of limb tissue associations in the development of nerve-induced supernumerary limbs in the newt Pleurodeles waltlii Michah*. Journal of Embryology and Experimental Morphology, 1977. **1977**(38): p. 151-73.
57. Dunis, D.A. and M. Namenwirth, *The role of grafted skin in the regeneration of X-irradiated axolotl limbs*. Dev. Biol., 1977. **56**: p. 97-109.
58. Muneoka, K. and S.V. Bryant, *Evidence that patterning mechanisms in developing and regenerating limbs are the same*. Nature, 1982. **298**: p. 369-371.
59. Muneoka, K. and S.V. Bryant, *Regeneration and development of vertebrate appendages*. Symp. Zool. Soc. Lond., 1984. **52**: p. 177-196.
60. Gardiner, D.M. and S.V. Bryant, *The tetrapod limb*, in "Cellular and Molecular Basis of Regeneration: From Invertebrates to Humans", P. Ferretti and J. Geraudie, Editors. 1998, Wiley and Sons, Inc.: New York.
61. Tank, P.W., B.M. Carlson, and T.G. Connelly, *A staging system for forelimb regeneration in the axolotl, Ambystoma mexicanum*. J. Morph., 1976. **150**: p. 117-128.
62. Schauble, M.K. and M.R. Nentwig, *Temperature and prolactin as control factors in newt forelimb regeneration*. J Exp Zool, 1974. **187**(3): p. 335-44.

63. Singer, M., *The influence of the nerve in regeneration of the amphibian extremity*. Quart. Rev. Biol., 1952. **27**: p. 169-200.
64. Shotté, O.E., E.G. Butler, and R.T. Hood, *Effects of transplanted blastemas on amputated nerveless limbs of urodele larvae*. Proc. Soc. Exp. Biol. Med., 1941. **48**: p. 500-503.
65. Mescher, A.L., G.W. White, and J.J. Brokaw, *Apoptosis in regenerating and denervated, nonregenerating urodele forelimbs*. Wound Repair Regen, 2000. **8**(2): p. 110-6.
66. Maden, M., *Experiments on Anuran limb buds and their significance for principles of vertebrate limb development*. J Embryol Exp Morphol, 1981. **63**: p. 243-65.
67. Mullen, L., et al., *Nerve dependency of regeneration: Role of Dlx and FGF signaling in amphibian limb regeneration*. Development, 1996. **122**(11): p. 3487-97.
68. Carlson, M.R., et al., *Expression of Hoxb13 and Hoxc10 in developing and regenerating Axolotl limbs and tails*. Dev Biol, 2001. **229**(2): p. 396-406.
69. Erlebacher, A., et al., *Toward a molecular understanding of skeletal development*. Cell, 1995. **80**(3): p. 371-8.
70. Hall, B.K. and T. Miyake, *All for one and one for all: condensations and the initiation of skeletal development*. Bioessays, 2000. **22**(2): p. 138-47.
71. DeLise, A.M., L. Fischer, and R.S. Tuan, *Cellular interactions and signaling in cartilage development*. Osteoarthritis Cartilage, 2000. **8**(5): p. 309-34.
72. Mundlos, S. and B.R. Olsen, *Heritable diseases of the skeleton. Part I: Molecular insights into skeletal development-transcription factors and signaling pathways*. Faseb J, 1997. **11**(2): p. 125-32.
73. Vortkamp, A., *Defining the skeletal elements*. Curr Biol, 1997. **7**(2): p. R104-7.
74. Wright, E., et al., *The Sry-related gene Sox9 is expressed during chondrogenesis in mouse embryos*. Nat Genet, 1995. **9**(1): p. 15-20.
75. Kronenberg, H.M., *Developmental regulation of the growth plate*. Nature, 2003. **423**(6937): p. 332-6.
76. Shum, L. and G. Nuckolls, *The life cycle of chondrocytes in the developing skeleton*. Arthritis Res, 2002. **4**(2): p. 94-106.
77. Komori, T., et al., *Targeted disruption of Cbfa1 results in a complete lack of bone formation owing to maturational arrest of osteoblasts*. Cell, 1997. **89**(5): p. 755-64.

78. Karsenty, G., *Genetics of skeletogenesis*. Dev Genet, 1998. **22**(4): p. 301-13.
79. Wagner, T., et al., *Autosomal sex reversal and campomelic dysplasia are caused by mutations in and around the SRY-related gene SOX9*. Cell, 1994. **79**(6): p. 1111-20.
80. Foster, J.W., et al., *Campomelic dysplasia and autosomal sex reversal caused by mutations in an SRY-related gene*. Nature, 1994. **372**(6506): p. 525-30.
81. Gubbay, J., et al., *A gene mapping to the sex-determining region of the mouse Y chromosome is a member of a novel family of embryonically expressed genes*. Nature, 1990. **346**(6281): p. 245-50.
82. Mertin, S., S.G. McDowall, and V.R. Harley, *The DNA-binding specificity of SOX9 and other SOX proteins*. Nucleic Acids Res, 1999. **27**(5): p. 1359-64.
83. Wegner, M., *From head to toes: the multiple facets of Sox proteins*. Nucleic Acids Res, 1999. **27**(6): p. 1409-20.
84. Lefebvre, V., et al., *SOX9 is a potent activator of the chondrocyte-specific enhancer of the pro alpha1(II) collagen gene*. Mol Cell Biol, 1997. **17**(4): p. 2336-46.
85. Healy, C., D. Uwanogho, and P.T. Sharpe, *Regulation and role of Sox9 in cartilage formation*. Dev Dyn, 1999. **215**(1): p. 69-78.
86. Ng, L.J., et al., *SOX9 binds DNA, activates transcription, and coexpresses with type II collagen during chondrogenesis in the mouse*. Dev Biol, 1997. **183**(1): p. 108-21.
87. Werner, M.H., et al., *Molecular basis of human 46X,Y sex reversal revealed from the three-dimensional solution structure of the human SRY-DNA complex*. Cell, 1995. **81**(5): p. 705-14.
88. Ohe, K., E. Lalli, and P. Sassone-Corsi, *A direct role of SRY and SOX proteins in pre-mRNA splicing*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2002. **99**(3): p. 1146-51.
89. Pevny, L.H. and R. Lovell-Badge, *Sox genes find their feet*. Curr Opin Genet Dev, 1997. **7**(3): p. 338-44.
90. OMIM online database, J.H.U., *Campomelic dwarfism, MIM number: 114290*: Baltimore, MD.
91. Wehrli, B.M., et al., *Sox9, a master regulator of chondrogenesis, distinguishes mesenchymal chondrosarcoma from other small blue round cell tumors*. Hum Pathol, 2003. **34**(3): p. 263-9.
92. Huang, W., et al., *The chondrogenic transcription factor Sox9 is a target of signaling by the parathyroid hormone-related peptide in the growth plate of endochondral bones*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2001. **98**(1): p. 160-5.



93. Bi, W., et al., *Sox9 is required for cartilage formation*. Nat Genet, 1999. **22**(1): p. 85-9.
94. Zhou, G., et al., *Three high mobility group-like sequences within a 48-base pair enhancer of the Col2a1 gene are required for cartilage-specific expression in vivo*. J Biol Chem, 1998. **273**(24): p. 14989-97.
95. Chimal-Monroy, J., et al., *Analysis of the molecular cascade responsible for mesodermal limb chondrogenesis: sox genes and BMP signaling*. Dev Biol, 2003. **257**(2): p. 292-301.
96. Yan, Y.L., et al., *A zebrafish sox9 gene required for cartilage morphogenesis*. Development, 2002. **129**(21): p. 5065-79.
97. Philbrick, W.M., et al., *Defining the roles of parathyroid hormone-related protein in normal physiology*. Physiol Rev, 1996. **76**(1): p. 127-73.
98. Strewler, G.J., et al., *Parathyroid hormonelike protein from human renal carcinoma cells. Structural and functional homology with parathyroid hormone*. J Clin Invest, 1987. **80**(6): p. 1803-7.
99. Moseley, J.M., et al., *Parathyroid hormone-related protein purified from a human lung cancer cell line*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1987. **84**(14): p. 5048-52.
100. Burtis, W.J., et al., *Identification of a novel 17,000-dalton parathyroid hormone-like adenylate cyclase-stimulating protein from a tumor associated with humoral hypercalcemia of malignancy*. J Biol Chem, 1987. **262**(15): p. 7151-6.
101. Karaplis, A.C., et al., *Lethal skeletal dysplasia from targeted disruption of the parathyroid hormone-related peptide gene*. Genes Dev, 1994. **8**(3): p. 277-89.
102. Mangin, M., K. Ikeda, and A.E. Broadus, *Structure of the mouse gene encoding parathyroid hormone-related peptide*. Gene, 1990. **95**(2): p. 195-202.
103. Yasuda, T., et al., *Rat parathyroid hormone-like peptide: comparison with the human homologue and expression in malignant and normal tissue*. Mol Endocrinol, 1989. **3**(3): p. 518-25.
104. Nguyen, M.T. and A.C. Karaplis, *The nucleus: a target site for parathyroid hormone-related peptide (PTHrP) action*. J Cell Biochem, 1998. **70**(2): p. 193-9.
105. Henderson, J.E., et al., *Nucleolar localization of parathyroid hormone-related peptide enhances survival of chondrocytes under conditions that promote apoptotic cell death*. Mol Cell Biol, 1995. **15**(8): p. 4064-75.

106. Fiaschi-Taesch, N.M. and A.F. Stewart, *Minireview: parathyroid hormone-related protein as an intracrine factor--trafficking mechanisms and functional consequences*. Endocrinology, 2003. **144**(2): p. 407-11.
107. Maioli, E. and V. Fortino, *The complexity of parathyroid hormone-related proteinsignalling*. Cell Mol Life Sci, 2004. **61**(3): p. 257-62.
108. Juppner, H., et al., *A G protein-linked receptor for parathyroid hormone and parathyroid hormone-related peptide*. Science, 1991. **254**(5034): p. 1024-6.
109. Schipani, E. and S. Provot, *PTHrP, PTH, and the PTH/PTHrP receptor in endochondral bone development*. Birth Defects Res Part C Embryo Today, 2003. **69**(4): p. 352-62.
110. Nissenson, R.A., *Parathyroid hormone-related protein*. Rev Endocr Metab Disord, 2000. **1**(4): p. 343-52.
111. Swarthout, J.T., et al., *Parathyroid hormone-dependent signaling pathways regulating genes in bone cells*. Gene, 2002. **282**(1-2): p. 1-17.
112. Abou-Samra, A.B., et al., *Expression cloning of a common receptor for parathyroid hormone and parathyroid hormone-related peptide from rat osteoblast-like cells: a single receptor stimulates intracellular accumulation of both cAMP and inositol trisphosphates and increases intracellular free calcium*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1992. **89**(7): p. 2732-6.
113. Karaplis, A.C. and D. Goltzman, *PTH and PTHrP effects on the skeleton*. Rev Endocr Metab Disord, 2000. **1**(4): p. 331-41.
114. Chung, U.I., et al., *The parathyroid hormone/parathyroid hormone-related peptide receptor coordinates endochondral bone development by directly controlling chondrocyte differentiation*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1998. **95**(22): p. 13030-5.
115. Lanske, B., et al., *Ablation of the PTHrP gene or the PTH/PTHrP receptor gene leads to distinct abnormalities in bone development*. J Clin Invest, 1999. **104**(4): p. 399-407.
116. Lee, K., J.D. Deeds, and G.V. Segre, *Expression of parathyroid hormone-related peptide and its receptor messenger ribonucleic acids during fetal development of rats*. Endocrinology, 1995. **136**(2): p. 453-63.
117. Serra, R., A. Karaplis, and P. Sohn, *Parathyroid hormone-related peptide (PTHrP)-dependent and -independent effects of transforming growth factor beta (TGF-beta) on endochondral bone formation*. J Cell Biol, 1999. **145**(4): p. 783-94.

118. Vortkamp, A., et al., *Regulation of rate of cartilage differentiation by Indian hedgehog and PTH-related protein*. Science, 1996. **273**(5275): p. 613-22.
119. Pateder, D.B., et al., *PTHrP expression in chondrocytes, regulation by TGF-beta, and interactions between epiphyseal and growth plate chondrocytes*. Exp Cell Res, 2000. **256**(2): p. 555-62.
120. Kania, M.A., et al., *The Drosophila segmentation gene runt encodes a novel nuclear regulatory protein that is also expressed in the developing nervous system*. Genes Dev, 1990. **4**(10): p. 1701-13.
121. Bae, S.C., et al., *Cloning, mapping and expression of PEBP2 alpha C, a third gene encoding the mammalian Runt domain*. Gene, 1995. **159**(2): p. 245-8.
122. Bae, S.C., et al., *Isolation of PEBP2 alpha B cDNA representing the mouse homolog of human acute myeloid leukemia gene, AML1*. Oncogene, 1993. **8**(3): p. 809-14.
123. Ogawa, E., et al., *PEBP2/PEA2 represents a family of transcription factors homologous to the products of the Drosophila runt gene and the human AML1 gene*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1993. **90**(14): p. 6859-63.
124. Ducy, P., et al., *Osf2/Cbfa1: a transcriptional activator of osteoblast differentiation*. Cell, 1997. **89**(5): p. 747-54.
125. Levanon, D., et al., *AML1, AML2, and AML3, the human members of the runt domain gene-family: cDNA structure, expression, and chromosomal localization*. Genomics, 1994. **23**(2): p. 425-32.
126. Mundlos, S., et al., *Mutations involving the transcription factor CBFA1 cause cleidocranial dysplasia*. Cell, 1997. **89**(5): p. 773-9.
127. Otto, F., et al., *Cbfa1, a candidate gene for cleidocranial dysplasia syndrome, is essential for osteoblast differentiation and bone development*. Cell, 1997. **89**(5): p. 765-71.
128. Enomoto, H., et al., *Cbfa1 is a positive regulatory factor in chondrocyte maturation*. J Biol Chem, 2000. **275**(12): p. 8695-702.
129. Yamaguchi, A., T. Komori, and T. Suda, *Regulation of osteoblast differentiation mediated by bone morphogenetic proteins, hedgehogs, and Cbfa1*. Endocr Rev, 2000. **21**(4): p. 393-411.
130. Stricker, S., et al., *Role of Runx genes in chondrocyte differentiation*. Dev Biol, 2002. **245**(1): p. 95-108.

131. Jimenez, M.J., et al., *Collagenase 3 is a target of Cbfa1, a transcription factor of the runt gene family involved in bone formation*. Mol Cell Biol, 1999. **19**(6): p. 4431-42.
132. Sato, M., et al., *Transcriptional regulation of osteopontin gene in vivo by PEBP2alphaA/CBFA1 and ETS1 in the skeletal tissues*. Oncogene, 1998. **17**(12): p. 1517-25.
133. Karsenty, G., *Role of Cbfa1 in osteoblast differentiation and function*. Semin Cell Dev Biol, 2000. **11**(5): p. 343-6.
134. Kim, I.S., et al., *Regulation of chondrocyte differentiation by Cbfa1*. Mech Dev, 1999. **80**(2): p. 159-70.
135. Linsenmayer, T.F. and G.N. Smith, Jr., *The biosynthesis of cartilage type collagen during limb regeneration in the larval salamander*. Dev Biol, 1976. **52**(1): p. 19-30.
136. Stone, C.A., *Unravelling the secrets of foetal wound healing: an insight into fracture repair in the mouse foetus and perspectives for clinical application*. Br J Plast Surg, 2000. **53**(4): p. 337-41.
137. Ferguson, C.M., et al., *Common molecular pathways in skeletal morphogenesis and repair*. Ann N Y Acad Sci, 1998. **857**: p. 33-42.
138. Bolander, M.E., *Regulation of fracture repair by growth factors*. Proc Soc Exp Biol Med, 1992. **200**(2): p. 165-70.
139. Vortkamp, A., et al., *Recapitulation of signals regulating embryonic bone formation during postnatal growth and in fracture repair*. Mech Dev, 1998. **71**(1-2): p. 65-76.
140. Sandberg, M.M., H.T. Aro, and E.I. Vuorio, *Gene expression during bone repair*. Clin Orthop, 1993(289): p. 292-312.
141. Le, A.X., et al., *Molecular aspects of healing in stabilized and non-stabilized fractures*. J Orthop Res, 2001. **19**(1): p. 78-84.
142. Beck, L.S., et al., *Combination of bone marrow and TGF-beta1 augment the healing of critical-sized bone defects*. J Pharm Sci, 1998. **87**(11): p. 1379-86.
143. Kloen, P., et al., *Expression and activation of the BMP-signaling components in human fracture nonunions*. J Bone Joint Surg Am, 2002. **84-A**(11): p. 1909-18.
144. Patrick, J. and R. Briggs, *Fate of cartilage cells in limb regeneration in the axolotl (Ambystoma mexicanum)*. Experientia, 1964. **20**(8): p. 431-2.
145. Hinterberger, T.J. and J.A. Cameron, *Muscle and cartilage differentiation in axolotl limb regeneration blastema cultures*. J Exp Zool, 1983. **226**(3): p. 399-407.

146. Saint-Germain, N., et al., *Specification of the otic placode depends on Sox9 function in Xenopus*. Development, 2004. **131**(8): p. 1755-63.
147. Cheung, M. and J. Briscoe, *Neural crest development is regulated by the transcription factor Sox9*. Development, 2003. **130**(23): p. 5681-93.
148. Tank, P.W., B.M. Carlson, and T.G. Connelly, *A staging system for forelimb regeneration in the axolotl, Ambystoma mexicanum*. J Morphol, 1976. **150**(1): p. 117-28.
149. Vega Flores, M., Tsang, V. W. K., Hu, W., Kalev-Zylinska, M., Postlethwait, J., Crosier, P., Crosier, K., Fisher, S., *Duplicate zebrafish runx2 orthologues are expressed in developing skeletal elements*. Gene Expr Patterns, 2004.
150. Stricker, S., et al., *Role of Runx genes in chondrocyte differentiation*. Dev Biol, 2002. **245**(1): p. 95-108.
151. Gilbert, S.F., *Developmental biology*. 7th ed. 2003, Sunderland, Mass.: Sinauer Associates. xvii, 838 p.
152. Spokony, R.F., et al., *The transcription factor Sox9 is required for cranial neural crest development in Xenopus*. Development, 2002. **129**(2): p. 421-32.
153. Chiang, E.F., et al., *Two sox9 genes on duplicated zebrafish chromosomes: expression of similar transcription activators in distinct sites*. Dev Biol, 2001. **231**(1): p. 149-63.
154. Torok, M.A., et al., *Expression of HoxD genes in developing and regenerating axolotl limbs*. Dev Biol, 1998. **200**(2): p. 225-33.
155. Torok, M.A., et al., *Sonic hedgehog (shh) expression in developing and regenerating axolotl limbs*. J Exp Zool, 1999. **284**(2): p. 197-206.
156. Muneoka, K., W.F. Fox, and S.V. Bryant, *Cellular contribution from dermis and cartilage to the regenerating limb blastema in axolotls*. Dev Biol, 1986. **116**(1): p. 256-60.
157. Akiyama, H., et al., *The transcription factor Sox9 has essential roles in successive steps of the chondrocyte differentiation pathway and is required for expression of Sox5 and Sox6*. Genes Dev, 2002. **16**(21): p. 2813-28.
158. Kulyk, W.M., J.L. Franklin, and L.M. Hoffman, *Sox9 expression during chondrogenesis in micromass cultures of embryonic limb mesenchyme*. Exp Cell Res, 2000. **255**(2): p. 327-32.

159. Tsuchiya, H., et al., *Chondrogenesis enhanced by overexpression of sox9 gene in mouse bone marrow-derived mesenchymal stem cells*. Biochem Biophys Res Commun, 2003. **301**(2): p. 338-43.
160. Cormier, S., A.L. Delezoide, and C. Silve, *Expression patterns of parathyroid hormone-related peptide (PTHrP) and parathyroid hormone receptor type 1 (PTHR1) during human development are suggestive of roles specific for each gene that are not mediated through the PTHrP/PTHR1 paracrine signaling pathway*. Gene Expr Patterns, 2003. **3**(1): p. 59-63.
161. Campos, R.V., S.L. Asa, and D.J. Drucker, *Immunocytochemical localization of parathyroid hormone-like peptide in the rat fetus*. Cancer Res, 1991. **51**(23 Pt 1): p. 6351-7.
162. Amizuka, N., et al., *Signalling by fibroblast growth factor receptor 3 and parathyroid hormone-related peptide coordinate cartilage and bone development*. Bone, 2004. **34**(1): p. 13-25.
163. Rodan, G.A. and T.J. Martin, *Role of osteoblasts in hormonal control of bone resorption--a hypothesis*. Calcif Tissue Int, 1981. **33**(4): p. 349-51.
164. Teitelbaum, S.L., *Bone resorption by osteoclasts*. Science, 2000. **289**(5484): p. 1504-8.
165. Minina, E., et al., *BMP and Ihh/PTHrP signaling interact to coordinate chondrocyte proliferation and differentiation*. Development, 2001. **128**(22): p. 4523-34.
166. de Crombrughe, B., et al., *Transcriptional mechanisms of chondrocyte differentiation*. Matrix Biol, 2000. **19**(5): p. 389-94.
167. Yoshida, C.A., et al., *Runx2 and Runx3 are essential for chondrocyte maturation, and Runx2 regulates limb growth through induction of Indian hedgehog*. Genes Dev, 2004. **18**(8): p. 952-63.
168. Dunis, D.A. and M. Namenwirth, *The role of grafted skin in the regeneration of x-irradiated axolotl limbs*. Dev Biol, 1977. **56**(1): p. 97-109.
169. Lheureux, E., *Replacement of irradiated epidermis by migration of non-irradiated epidermis in the newt limb: the necessity of healthy epidermis for regeneration*. J Embryol Exp Morphol, 1983. **76**: p. 217-34.

## Lexique

**Cartilage permanent** : type de cartilage qui ne s'ossifie jamais et que l'on retrouve au niveau des jointures, du nez, des oreilles, etc.

**Cartilage primordia** : premier type de cartilage que l'on retrouve juste après la condensation des cellules du mésenchyme

**Cellules périchondriales** : généralement des cellules chondrocytaires que l'on retrouve dans l'enveloppe de l'os que l'on appelle périchondrium

**Chondroclastes** : cellules d'origine hématopoïétique qui sont responsables de la dégradation de la matrice cartilagineuse

**Chondrocytes** : principale cellule composant le cartilage, elle sécrète la matrice de collagène nécessaire à la formation du cartilage

**Chondrocyte hypertrophique** : représente le dernier stade de la différenciation des chondrocytes, après ce stade, les chondrocytes entreront en apoptose et seront entourés d'une matrice minéralisée

**Chondrogénèse** : Processus de formation du cartilage

**Crête neurale** : bande d'ectoderme spécialisée localisée de chaque côté de la plaque neurale lors du développement embryonnaire

**Cytokines** : protéines qui permet la communication entre les cellules immunitaires et le reste du corps.

**Domaine digital, tarsial ou autopodial** : partie de la patte de l'animal qui comprend la main et les doigts

**Domaine zeugopodial** : partie de la patte de l'animal qui comprend l'avant-bras

**Domaine stylopodial** : partie de la patte de l'animal qui comprend le haut du bras du coude jusqu'à l'épaule

**Ostéoblaste** : cellule qui sécrète la matrice osseuse

**Ostéoclaste** : cellule d'origine hématopoïétique qui est responsable de la résorption de la matrice osseuse

**Phagocyte** : cellule d'origine hématopoïétique, tels les macrophages qui est responsable de retirer des débris cellulaires ou des bactéries

**Plaque latérale** : masse non-segmentée de mésoderme qui donne naissance au coelome

**Préchondrocyte ou précurseur chondrocytaire:** cellule de mésenchymes destinée à se différencier en chondrocytes

**Sclérotome :** portion de cellules mésenchymateuses embryonnaires qui donne au squelette axial.

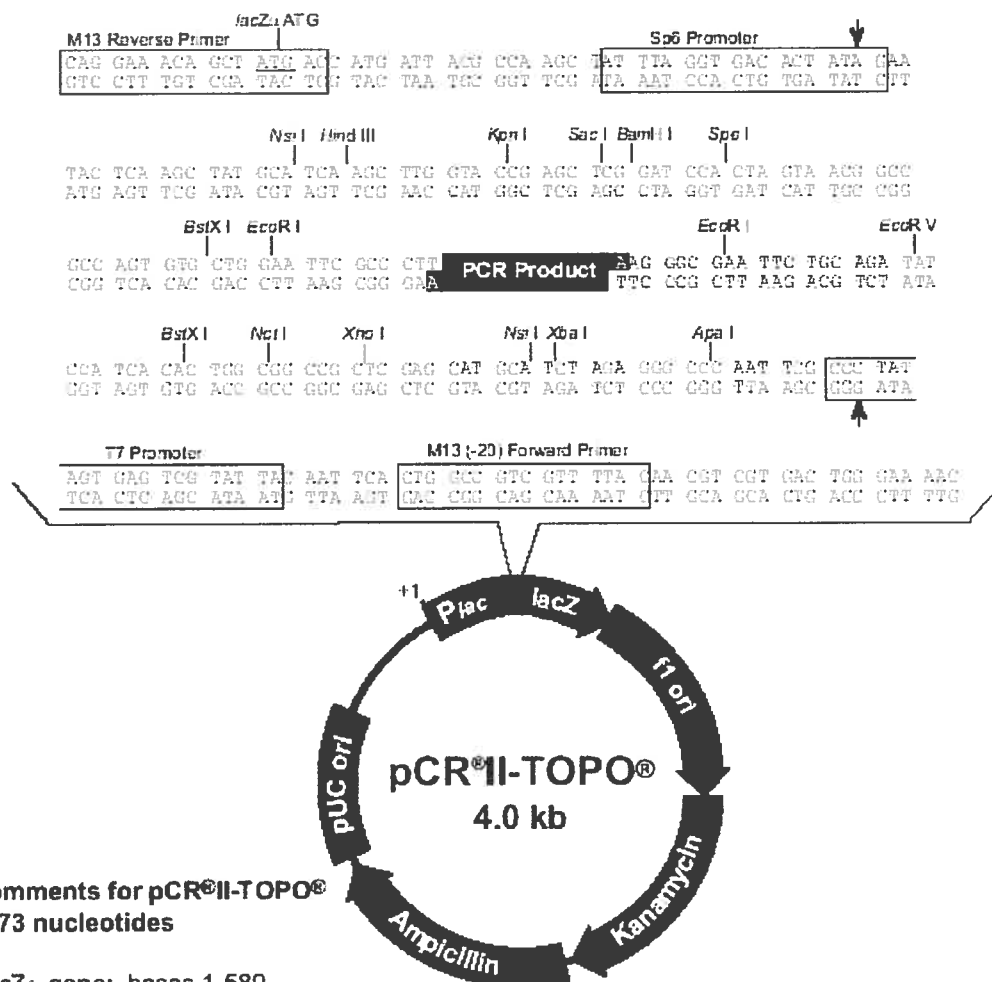
**Stade pupal :** stade de développement de certains insectes, où la larve s'entoure d'une enveloppe de cuticule durant sa métamorphose

**Tectum Synoticum (synotic):** plaque cartilagineuse qui recouvre plusieurs structures du crâne, tel les placodes otiques et les région olfactives du cerveau de certains animaux



### **Annexe 1 : Cartes des plasmides utilisés**

# Plasmide utilisé pour le clonage des produits de PCR (Invotrogen, CA)

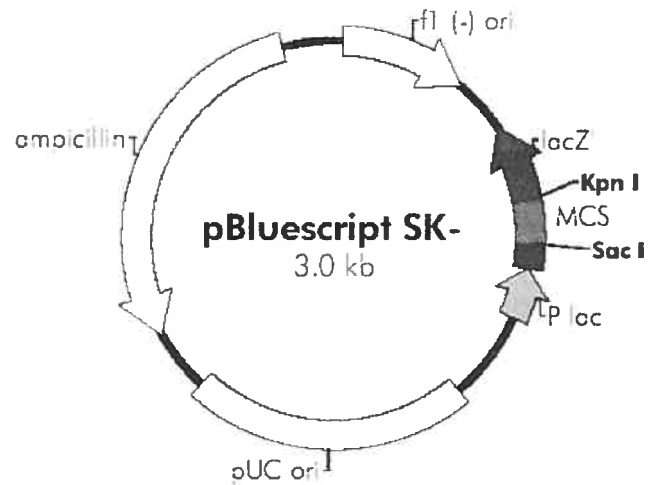


## Comments for pCR®II-TOPO® 3973 nucleotides

LacZα gene: bases 1-589  
 M13 Reverse priming site: bases 205-221  
 Sp6 promoter: bases 239-256  
 Multiple Cloning Site: bases 269-383  
 T7 promoter: bases 406-425  
 M13 (-20) Forward priming site: bases 433-448  
 f1 origin: bases 590-1027  
 Kanamycin resistance ORF: bases 1361-2155  
 Ampicillin resistance ORF: bases 2173-3033  
 pUC origin: bases 3178-3851

Plasmide utilisé pour l'excision des phages de la librairie d'ADNc (Stratagene, CA)

**f1 (-) origin** 24-330  
 **$\beta$ -galactosidase  $\alpha$ -fragment** 463-816  
**multiple cloning site** 653-760  
**lac promoter** 817-938  
**pUC origin** 1158-1825  
**ampicillin resistance (*bla*) ORF** 1976-2833



**pBluescript SK (+/-) Multiple Cloning Site Region**  
 (sequence shown 601-826)

